



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

ANA FLÁVIA OLIVEIRA PAMPOLHA

**A SINALIZAÇÃO ADENOSINÉRGICA NA REGULAÇÃO DA
GRAVIDADE DA SEPSE E DA LIBERAÇÃO DE
ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS
(NETS)**

BELÉM-PA

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

**A SINALIZAÇÃO ADENOSINÉRGICA NA REGULAÇÃO DA
GRAVIDADE DA SEPSE E DA LIBERAÇÃO DE
ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS
(NETS)**

Autor(a): ANA FLÁVIA OLIVEIRA PAMPOLHA

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a MARTA CHAGAS MONTEIRO

Co-orientador: Prof. Dr. FERNANDO QUEIROZ CUNHA

Documento de Dissertação apresentado
ao Programa de Pós-graduação em
Farmacologia e Bioquímica do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Pará como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia e Bioquímica.

BELÉM-PA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P185s Pampolha, Ana Flávia Oliveira.
A sinalização adenosinérgica na regulação da gravidade da
seps e da liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos
(NETs) / Ana Flávia Oliveira Pampolha. — 2024.
50 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Marta Chagas Monteiro
Coorientador(a): Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em
Farmacologia e Bioquímica, Belém, 2024.
1. Adenosina. 2. Seps. 3. Neutrófilos. 4. Armadilhas
Extracelulares de Neutrófilos. 5. Sinalização Purinérgica. I.
Título.

CDD 610

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Flávia Oliveira Pampolha

A SINALIZAÇÃO ADENOSINÉRGICA NA REGULAÇÃO DA GRAVIDADE DA SEPSE E DA LIBERAÇÃO DE ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS)

Documento de Dissertação apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Bioquímica.

Aprovado em: 04/08/2024

Banca Examinadora:

Presidente: Prof^a. Dr^a. Marta Chagas Monteiro

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
gov.br MARTA CHAGAS MONTEIRO
Data: 06/09/2024 10:54:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador 1: Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
gov.br PEDRO ROOSEVELT TORRES ROMAO
Data: 06/09/2024 22:54:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador 2: Prof. Dr. Eneas de Andrade Fontes Junior

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
gov.br ENEAS DE ANDRADE FONTES JUNIOR
Data: 06/09/2024 12:49:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Leni Nunes de Oliveira, João Bosco Soares Pampolha Júnior e Ana Beatriz Oliveira Pampolha, minha família, que acima de tudo, esteve sempre ao meu lado em todos os processos da minha vida e nunca hesitaram em apoiar minhas decisões acadêmicas. Hoje, celebramos juntos o fruto deste árduo esforço.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Marta Chagas Monteiro pela orientação e apoio inestimáveis, por sua orientação e pelos conselhos valiosos que contribuíram significativamente para minha formação acadêmica e profissional.

Ao Professor Doutor Fernando Queiroz Cunha, pois sua expertise, paciência e dedicação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu inteligentíssimo amigo e mestre Anderson Ramos, que não mediu esforços para me ajudar nessa pesquisa e que, além de um grande colaborador, foi também um amigo excepcional e valioso. Obrigada por reacender em mim a chama da paixão pela ciência nos momentos mais difíceis que enfrentei até aqui.

Aos meus amigos de laboratório Daniele Nascimento, Maísa Leandro, Victor Costa e Paulo Augusto pela contribuição à minha pesquisa e pelos momentos de descontração que compartilhamos ao longo deste processo. Vossa colaboração e espírito alegre foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e tornaram a minha jornada muito mais gratificante.

Aos técnicos Marcela Grando, Kátia Santos, Diva Montanha, Ieda Regina da Universidade de São Paulo e Carla Mendonça, da Universidade Federal do Pará. Vosso suporte técnico foram fundamentais para a realização dos experimentos e para a qualidade dos resultados obtidos.

À toda equipe do Laboratório de Ensaios In vitro, Imunologia e Microbiologia, em especial à Kelly Navegantes, pelos conselhos, apoio e paciência. Desejo sucesso a todos com quem pude trabalhar e discutir ciência.

À minha companheira, Paula Paixão, cujo apoio constante e compreensão foram fundamentais ao longo desta jornada. Sua presença, por si só, proporcionou-me uma felicidade imensurável e me ajudou nos momentos difíceis. Obrigada por estar ao meu lado, até mesmo em experimentos, e por tudo o que fez por mim.

À minha grande amiga Débora Moraes, de quem sentirei muitas saudades, e que me ensinou a espantar os males com um sorriso. E à Maria do Carmo, que me ensinou muito sobre a vida e a importância de manter a esperança em um mundo melhor.

“Chegamos agora a um ponto em que afundamos tão profundamente, que a reafirmação do óbvio é o primeiro dever dos homens inteligentes.”

In front of your nose - George Orwell.

RESUMO

Neutrófilos expressam diferentes receptores purinérgicos, incluindo quatro receptores P1 de adenosina, que regulam suas funções primárias, como migração e produção de mediadores inflamatórios, incluindo armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Na sepse, as NETs desempenham um papel duplo: possuem propriedades microbicidas, mas também contribuem para o dano orgânico, levando à falência múltipla de órgãos e agravando a condição clínica. Neste estudo, investigamos o papel da adenosina na liberação de NETs e na progressão da sepse experimental induzida pelos modelos de Ligadura e Punção do Ceco (CLP) ou endotoxemia. Observamos que o tratamento de camundongos submetidos a ambos os modelos com adenosina deaminase (ADA), que metaboliza adenosina em inosina, agrava o dano orgânico e reduz a taxa de sobrevivência dos animais sépticos. Apoiado por esses achados, demonstramos que a produção de NETs in vitro por neutrófilos estimulados com PMA foi aumentada pelo tratamento com ADA e reduzida por NECA, uma molécula que mimetiza as ações da adenosina. A modulação da produção de NETs pela adenosina foi atribuída à ativação dos receptores $A_{2A}AR$. Em conclusão, nossos resultados sugerem que, durante a sepse, a adenosina é liberada e diminui a produção de NETs via ativação do receptor $A_{2A}AR$.

Palavras-chave: Adenosina, Sepse, Neutrófilos, Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs), Sinalização Purinérgica.

ABSTRACT

Neutrophils express different purinergic receptors, including four adenosine-ligand P1 receptors, which regulate their primary functions, such as migration and production of inflammatory mediators, including neutrophil extracellular traps (NETs). In sepsis, NETs exhibit a dual role: microbicidal properties but also contribute to organ damage, leading to multiple organ failure and worsening the clinical condition. In this study, we investigated the role of adenosine in NETs release and the progression of experimental sepsis induced by the Cecum Ligation and Puncture (CLP) or endotoxemia models. We observed that treatment of mice subjected to both models with adenosine deaminase (ADA), which metabolizes adenosine to inosine, aggravates organ damage and reduces the survival rate of septic animals. Supporting these findings, we demonstrated that NET production *in vitro* by neutrophils stimulated with PMA was enhanced by ADA treatment and reduced by NECA, a molecule that mimics adenosine's actions. The modulation of NET production by adenosine was attributed to the activation of A_{2A}AR receptors. In conclusion, our results suggest that during sepsis, adenosine is released and decrease NET production via A_{2A}AR activation.

Keywords: Adenosine, Sepsis, Neutrophils, Neutrophil Extracellular Traps (NETs), Purinergic signaling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Processo inflamatório da sepse. Esquema ilustrando a fase inflamatória da sepse. O processo inicia-se com a diapedese e a interação entre PAMPs e PRRs. Esse reconhecimento desencadeia uma cascata inflamatória, marcada pela ativação do inflamassoma, DAMPs como os componentes presentes nas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e tempestade de citocinas. A fase hiperinflamatória resultante é seguida por imunossupressão, causada pela exaustão e morte celular, culminando em falência de órgãos e choque séptico. Próprio autor. Criado com BioRender.com..... 4
- Figura 2. Sinalização purinérgica. Imagem esquemática representando a sinalização purinérgica com ênfase na produção de adenosina e sua resposta efetora de acordo com a modulação da via do AMP cíclico (AMPC) pelos receptores A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR e A₃AR. Próprio autor. Criado com BioRender.com..... 6
- Figura 3. Desenho esquemático do experimento de ligadura e punção cecal. Próprio autor. Criado com BioRender.com..... 9
- Figura 4. Diagrama esquemático do experimento de sobrevivência e coleta de amostras de camundongos endotoxêmicos. Próprio autor. Criado com BioRender.com..... 10
- Figura 5. Desenho esquemático do experimento de cinética de detecção de NETs com Sytox™ Green. Próprio autor. Criado com BioRender.com..... 12
- Figura 6. A Modulação da adenosina via adenosina deaminase (ADA) reduz a sobrevivência na sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP). Depleção de Adenosina via Adenosina Deaminase (ADA) Reduz a Taxa de Sobrevivência no Modelo de Ligadura e Punção Cecal (CLP). Curva de sobrevivência, expressa em porcentagem, para os grupos sham (controle), CLP + PBS (veículo) e CLP + ADA 5U/animal. Seis animais por grupo, com os experimentos repetidos duas vezes. Para a análise estatística, os animais dos experimentos individuais foram agrupados. P = 0.0057 comparando CLP com CLP + ADA 5U. Teste de Mantel-Cox. 14
- Figura 7. A modulação da adenosina via adenosina deaminase (ADA) agrava a lesão tecidual pulmonar na sepse induzida por CLP. Imagem representativa de corte histológico corado com H&E de pulmão de animais controle (sham), CLP + veículo e CLP + ADA 5U/animal. A coloração H&E mostrou alterações histológicas nos grupos CLP e, de forma mais grave, no grupo tratado com ADA. Asterisco vermelho = bronquíolo terminal; asterisco azul = ducto alveolar; asterisco preto = alvéolo; círculo vermelho = edema; círculo preto e seta vermelha = hemácias/hemorragia; setas amarelas = infiltrado leucocitário; seta azul = necrose e descamação do bronquíolo; setas pretas = macrófagos alveolares; seta branca = infiltrado de linfócitos. 15
- Figura 8. A modulação da adenosina via ADA reduz a sobrevivência em camundongos submetidos à endotoxemia induzida por LPS de *E. coli*. Curva de sobrevivência, em porcentagem, para os grupos controle, LPS 40 mg/kg + PBS 1x e LPS + ADA 5U/animal. Cinco animais por grupo, com os experimentos repetidos duas vezes. Para a análise estatística, os animais dos experimentos individuais foram agrupados. P = 0.0172 comparando LPS com LPS + ADA 5U. Teste de Mantel-Cox. 16
- Figura 9. A modulação da adenosina via ADA agrava a lesão pulmonar na endotoxemia induzida por LPS. Imagem representativa de corte histológico corado com H&E de pulmão de animais controle, LPS + veículo e LPS +

- ADA 5U/animal. Círculo preto = necrose e descamação do bronquíolo; seta vermelha = macrófagos alveolares no infiltrado leucocitário; seta amarela = hemácias/hemorragia. 17
- Figura 10. A modulação da adenosina via ADA agrava a lesão renal na endotoxemia induzida por LPS. Imagem representativa de corte histológico corado com H&E de rim de camundongos Balb-c controle, LPS + veículo e LPS + ADA 5U/animal. Asterisco branco = glomérulo; asterisco preto = túbulo proximal; asterisco azul = túbulo distal; seta branca = necrose glomerular; setas vermelhas = hemácias/hemorragia; seta amarela = infiltrado leucocitário. 18
- Figura 11. A adenosina reduz a liberação de NETs induzida por PMA de maneira dose-dependente. (a) Curva cinética e (b) área sob a curva da detecção de NETs (dsDNA-Sytox™ Green) em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Balb-c WT, estimulados por 5 horas com 50 μ M de PMA, com ou sem pré-tratamento com NECA nas concentrações de 100, 300 e 900 μ M. O número de neutrófilos por poço foi de 2.5×10^5 células, e os experimentos foram realizados em quadruplicado; *P < 0.0001 comparando Controle com o grupo PMA + NECA 100 μ M; **P = 0.0284 comparando PMA com PMA + NECA 900 μ M; ANOVA unidirecional seguida pelo teste T de Student. 19
- Figura 12. A degradação de adenosina via ADA aumenta a liberação de NETs induzida por PMA. (a) Curva cinética e (b) área sob a curva da detecção de NETs em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Balb-c WT, estimulados por 5 horas com 50 μ M de PMA, com ou sem pré-tratamento com 1U de Adenosina Deaminase. O número de neutrófilos por poço foi de 2.5×10^5 células, e os experimentos foram realizados em quadruplicado. *P < 0.0001; ANOVA unidirecional seguida pelo teste T de Student. 20
- Figura 13. A degradação de adenosina via ADA aumenta as NETs induzidas por PMA. Imagens representativas de imunofluorescência de neutrófilos polimorfonucleares de camundongos WT: (a) controle, (b) estimulados com PMA 50 nM, e (c) e (d) estimulados com PMA 50 nM + pré-tratamento com ADA 1U. O DNA (intra e extracelular) foi marcado com DAPI, e o DNA extracelular foi marcado com SYTOX Green. As imagens foram capturadas com aumento de 40x. 21
- Figura 14. O receptor A2a de adenosina reduz a liberação de NETs no estímulo com PMA. (a) Curva cinética e (b) área sob a curva da detecção de NETs em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Balb-c WT, estimulados por 5 horas com 50 μ M de PMA, com ou sem pré-tratamento com NECA 900 μ M + ZM241385 1 μ M. O número de neutrófilos por poço foi de 2.5×10^5 células, e os experimentos foram realizados em quadruplicado. *P = 0.0051 comparando Controle com PMA; **P = 0.0001 comparando os grupos PMA com PMA + NECA + ZM241385; ANOVA unidirecional seguida pelo teste T de Student. 22

LISTA DE ABREVIACÕES

ADA: Adenosine Deaminase

ADO: Adenosine

AR: Adenosine Receptor

ADP: Adenosine Diphosphate

AMP: Adenosine Monophosphate

ATP: Adenosine Triphosphate

NECA: 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine

DPCPX: 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

NETs: Neutrophil Extracellular Traps

LPS: Lipopolysaccharides

A1AR: Adenosine A1 Receptor

A2AAR: Adenosine A2A Receptor

A2bAR: Adenosine A2b Receptor

A3AR: Adenosine A3 Receptor

PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns

DAMPs: Damage-Associated Molecular Patterns

RRPs: Reactive Oxygen Species

PMNs: Polymorphonuclear Neutrophils

CLP: Cecal Ligation and Puncture

ZM241,385: A selective antagonist for the Adenosine A2A receptor

MRS 1754: A selective antagonist for the Adenosine A2B receptor

Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES E IMUNOGLOBULINAS COMO PARAMETRO DE AGRAVAMENTO EM TRÊS NÍVEIS DE SEPSE EM MODELO MURINO", protocolada sob o CEUA nº 9378290822 (ID 002057), sob a responsabilidade de **Marta Chagas Monteiro e equipe; Ana Flávia Oliveira Pampolha** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 27/10/2022.

We certify that the proposal "EVALUATION OF BIOMARKERS AND IMMUNOGLOBULINS AS A PARAMETER OF AGGRAVATION IN THREE LEVELS OF SEPSIS IN A MURINE MODEL", utilizing 60 Isogenic rats (60 males), protocol number CEUA 9378290822 (ID 002057), under the responsibility of **Marta Chagas Monteiro and team; Ana Flávia Oliveira Pampolha** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 10/27/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2022** a **09/2022**

Área: **Neurociências**

Origem: **Biotério Central ICB/UFPA**

Espécie: **Ratos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **6 a 9 semanas**

N: **60**

Linhagem: **Mus Musculus**

Peso: **180 a 250 g**

Local do experimento: **LABORATÓRIO DE ENSAIOS IN VITRO, IMUNOLOGIA E MICROBIOLOGIA - LABEIM**

Belém, 28 de junho de 2024

Prof. Dra. Barbarella de Matos Macchi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. James Tony Lee
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



AUTORIZAÇÃO

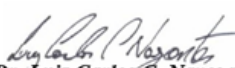
A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: ***“Papel das NETs na doença inflamatória intestinal experimental”***, registrado com o número do protocolo **079/2021**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 30 de agosto de 2021.

Colaborador: Anderson dos Santos Ramos

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica		
Vigência da autorização			30/08/2021 a 15/04/2025		
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem	
Camundongo / Balb c	160	18g / 42 dias	Macho	Serviço de Biotério	

Ribeirão Preto, 30 de agosto de 2021


Prof. Dr. Luiz Carlos C. Navegantes
Coordenador da CEUA/FMRP-USP

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO	IV
DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	X
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XII
CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DA SEPSE	1
1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	2
1.3 O PAPEL DAS ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS NAS SÍNDROMES INFLAMATÓRIAS.....	3
1.1 SISTEMA PURINÉRGICO E ADENOSINA	5
2 OBJETIVOS.....	7
2.1 GERAL.....	7
2.2 ESPECÍFICOS	7
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	8
3.2 INDUÇÃO DE SEPSE POR LIGADURA E PUNÇÃO CECAL	8
3.1 INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA POR LPS PARA ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	9
3.1 COLETA ÓRGÃOS	10
3.1 CONFEÇÃO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS	10
3.2 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES (PMNs) DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS	11
3.3 CINÉTICA DE DETECÇÃO DA LIBERAÇÃO DE NETs POR SYTOX™ GREEN.....	11
3.4 DETECÇÃO DE NETs POR IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA	12
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	12

4	RESULTADOS.....	14
4.1	A MODULAÇÃO DA ADENOSINA VIA ADENOSINA DEAMINASE (ADA) REDUZ A SOBREVIVÊNCIA NA SEPSE INDUZIDA POR LIGADURA E PUNÇÃO CECAL (CLP).....	14
4.2	A MODULAÇÃO DA ADENOSINA VIA ADENOSINA DEAMINASE (ADA) AGRAVA A LESÃO TECIDUAL PULMONAR NA SEPSE INDUZIDA POR CLP	15
4.3	A MODULAÇÃO DA ADENOSINA VIA ADA REDUZ A SOBREVIVÊNCIA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ENDOTOXEMIA INDUZIDA POR LPS DE <i>E. COLI</i>	16
4.4	A MODULAÇÃO DA ADENOSINA VIA ADA AGRAVA A LESÃO PULMONAR E RENAL NA ENDOTOXEMIA INDUZIDA POR LPS	17
4.5	A ADENOSINA REDUZ A LIBERAÇÃO DE NETs INDUZIDA POR PMA DE MANEIRA DOSE-DEPENDENTE.....	18
4.6	A DEGRADAÇÃO DE ADENOSINA VIA ADA AUMENTA A LIBERAÇÃO DE NETs INDUZIDA POR PMA	19
4.7	O RECEPTOR DE ADENOSINA A2A REDUZ A LIBERAÇÃO DE NETs ESTIMULADAS POR PMA.....	21
5	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO	25
7	REFERÊNCIAS	26
8	COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características clínicas e epidemiológicas da sepse

Os microrganismos responsáveis pela maioria dos casos de sepse e choque séptico são as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* e as gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (GATICA et al., 2023). A resposta imune inata do hospedeiro inicia após interação entre os padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Pattern* – PAMPs) derivados dos microrganismos e os receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors* – PRRs) presente nos leucócitos (GHNEW et al., 2020).

A interação entre PAMPs e PRRs desencadeia a ativação de genes envolvidos na resposta inflamatória do hospedeiro, produzindo citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e substâncias vasoativas, como o óxido nítrico (TU et al., 2022). Nesse processo, moléculas de adesão são expressas no endotélio vascular próximo ao local da infecção, promovendo o recrutamento de células do sistema imunológico por meio da quimiotaxia (KRAUS; GRUBER, 2021). Dessa forma, os leucócitos são ativados, principalmente os neutrófilos, e realizam a diapedese, processo caracterizado pela expressão e interação entre as moléculas de adesão do endotélio e do leucócito que permitem sua migração para o tecido inflamado (SCHOPPMAYER; VAN BUUL, 2021).

Durante a ação dos leucócitos, ocorre a liberação de padrões moleculares associados ao dano (*Damage-Associated Molecular Pattern* – DAMPs), moléculas intracelulares que são liberadas no espaço extracelular em resposta ao estresse celular (MURAO, et al., 2021). Juntamente com os PAMPs, os DAMPs são reconhecidos por receptores *Toll-like* (TLRs) (PAWLUK et al., 2020). Essa interação induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β) e IL-6, que medeiam a resposta precoce do sistema imunológico inato (LI et al., 2023) e citocinas quimiotáticas de células imunes como IL-8 (SAWANT et al., 2021; TEIJEIRA et al., 2021).

Em doenças como a sepse, ocorre uma reação desregulada na qual as citocinas liberadas induzem a expressão do fator tecidual, resultando na formação de trombos. Esses trombos agregam microrganismos e ativam plaquetas, a cascata de coagulação e o sistema complemento (CICCHINELLI et al., 2024; KUMAR et al., 2021). A lesão tecidual resultante desse mecanismo desencadeia um ciclo de hiperativação de células imunológicas e liberação de altos

níveis de citocinas, fenômeno conhecido como tempestade de citocinas, que culmina em uma síndrome inflamatória sistêmica (JARCZAK et al., 2022; FAJGENBAUM; JUNE, 2020).

Após a fase hiperinflamatória, inicia-se a fase de imunossupressão, caracterizada pela tolerância a endotoxinas, liberação de mediadores anti-inflamatórios, morte de leucócitos e aumento na produção de células imunomoduladoras, como as células T reguladoras (Tregs) e as células supressoras derivadas de mieloides (*Myeloid-Derived Suppressor Cells* – MDSCs) (LIU et al., 2022). Durante esse período, ocorre a exaustão celular devido ao alto consumo energético, levando à falência múltipla de órgãos e ao choque séptico (TORRES et al., 2022).

1.2 Fisiopatologia da sepse

Um dos principais processos avaliados na sepse é o desequilíbrio hemodinâmico. Nesse contexto, a sepse pode levar à síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), resultado da hiperativação de leucócitos e de seus mediadores em órgãos distantes do foco da infecção (CHANG, 2019). Os primeiros órgãos afetados são os pulmões e o coração em decorrência da disóxia. Com a diminuição do fornecimento de oxigênio e o consequente déficit energético, há falha nos mecanismos de desintoxicação, que afeta subsequentemente os rins e o fígado (BAUER et al., 2018).

Diante disso, a disfunção cardiovascular caracteriza-se pela baixa saturação venosa central de oxigênio e pela hipotensão resultante da hipovolemia, redução do tônus vascular e da depressão miocárdica (LELUBRE; VINCENT, 2018). Na sepse, os pulmões são os órgãos mais afetados, pois ocorre apoptose das células epiteliais pulmonares e perda da barreira epitelial (LI et al., 2022; XU et al., 2024). Essa lesão resulta em inundação intersticial e intra-alveolar (edema) e culmina no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (LPA) (GONG et al., 2022).

Nos rins, a sepse provoca inflamação dos néfrons e comprometimento glomerular devido a lesões de isquemia-reperfusão, bem como dano e apoptose tubular induzidos por citocinas e quimiocinas. Esses processos resultam em fibrose e na transição do tecido endotelial para mesenquimal (ZARBOCK et al., 2023; BALKRISHNA et al., 2023). Tais eventos culminam em lesão renal aguda (LRA), caracterizada por uma súbita redução da taxa de filtração glomerular (TFG), proteinúria elevada e vasoconstrição renal (PINTO et al., 2012; DANTAS et al., 2023).

Nesse processo, a adenosina (ADO) destaca-se como um nucleosídeo crucial para o equilíbrio inflamatório (EFFENDI et al., 2021). Nos rins, a ADO desempenha um papel

fundamental na modulação do fluxo túbulo-glomerular, na liberação de renina e no controle do tônus vascular renal (JOST; BIZUTI, 2021). Em casos de inflamação renal, observa-se um aumento nos níveis séricos de adenosina deaminase (ADA), enzima responsável pela degradação da ADO (CHIELLE, 2015). Adicionalmente, estudos sugerem que a administração de ADO em pacientes com síndrome respiratória aguda grave pode contribuir para a resolução do processo inflamatório (CARACCIOLA et al., 2021).

1.3 O papel das armadilhas extracelulares de neutrófilos nas Síndromes Inflamatórias

Nesse contexto, os neutrófilos são células cruciais para a resposta inata a patógenos, sendo a fagocitose, a degranulação e a NETose, que é o processo de formação e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), os seus principais mecanismos de morte (CHAN et al., 2021; GIERLIKOWSKA et al., 2022). As NETs são estruturas extracelulares compostas por uma rede de DNA, histonas, grânulos e proteínas antimicrobianas, que capturam e imobilizam patógenos, desempenhando um papel crucial no clearance da infecção (MUTUA; GERSHWIN, 2021).

A ativação das NETs inicia-se com o estímulo de PRRs (receptores Toll-like, por exemplo) ou na presença de substâncias como acetato de tetradecanoilforbol (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate - PMA) seguido pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e mobilização de cálcio, que leva à ativação da proteína arginina deiminase 4 (PAD-4) e consequentemente à descondensação da cromatina (OU et al., 2021). Posteriormente, a elastase neutrofílica (NE) e a mieloperoxidase (MPO) são translocadas para o núcleo, ocorre maior descondensação da cromatina e ruptura do núcleo. A cromatina então agrega proteínas granulares e citosólicas e, por fim, ocorre a ruptura da membrana plasmática e liberação das NETs (MATTA et al., 2022).

Portanto, os neutrófilos ativados na sepse apresentam meia-vida mais longa e têm a capacidade de explosão oxidativa reduzida, com formas mais imaturas em circulação. Além disso, a liberação de NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos) causa disfunção endotelial e coagulação alterada (GHNEWAA et al., 2020). Apesar do excelente papel microbicida, quando esse processo é exagerado ou a depuração das NETs é diminuída, pode contribuir para danos nos tecidos e órgãos do hospedeiro (CESTA et al., 2022).

O controle das NETs ocorre por meio da regulação das vias de ativação, incluindo a via da Gasdermina D (SPEL; MARTINON, 2018; ZHAO et al., 2023), a via da PAD4

(ACKERMANN et al., 2021), ativada por ROS e PMA (JORCH; KUBES, 2017), e a via do AMP cíclico estimulada pela adenosina (XU et al., 2019). Contudo, a via de ativação da produção de NETs via adenosina depende do subtipo do receptor: A_1AR aumenta e $A_{2A}AR$ suprime a NETose (RIFF et al., 2021). Nesse contexto, CUNHA et al. (2019) demonstraram que a inibição da produção e/ou liberação, ou a degradação das NETs reduzem as lesões observadas na sepse (COLON et al., 2019), na COVID-19 (SILVA et al., 2022), na artrite reumatoide (SCHNEIDER et al., 2023) e na colite (RAMOS et al., 2021), resultando em melhora clínica dos animais.

Portanto, embora existam evidências experimentais de que a sinalização da adenosina através de $A_{2A}AR$ suprime a resposta inflamatória na sepse (NASCIMENTO et al., 2021), não está claro se a produção da adenosina durante a fase aguda da sepse modula a produção de NETs pelos neutrófilos e, por conseguinte, reduz a intensidade de lesões em órgãos, sendo este o objetivo do presente estudo. Diante disso, os modelos animais de sepse, como a Ligadura e Punção Cecal (Cecal Ligation and Puncture - CLP) e a indução de endotoxemia por injeção de LPS, são amplamente utilizados para a análise dos mecanismos subjacentes a essa patologia (WU et al., 2020).

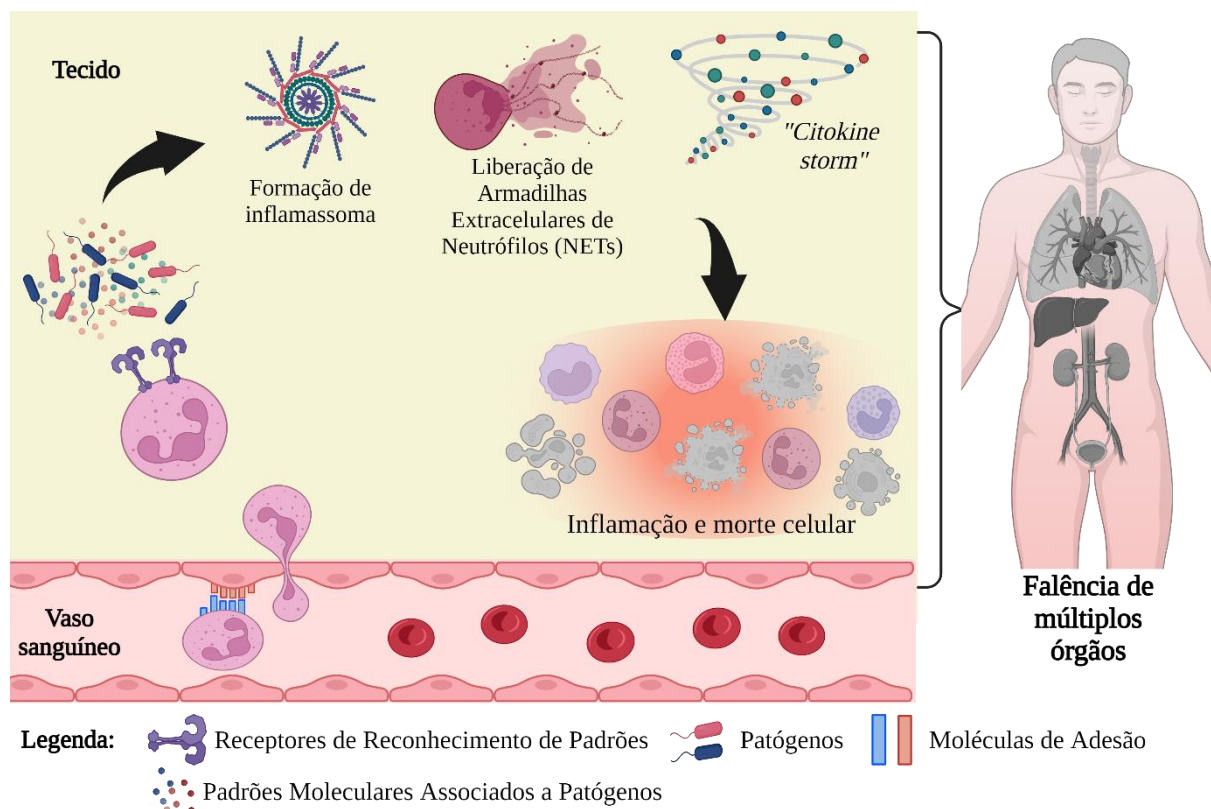


Figura 1. Processo inflamatório da sepse. Esquema ilustrando a fase inflamatória da sepse. O processo inicia-se com a diapedese e a interação entre PAMPs e PRRs. Esse reconhecimento desencadeia uma

cascata inflamatória, marcada pela ativação do inflamassoma, DAMPs como os componentes presentes nas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e tempestade de citocinas. A fase hiperinflamatória resultante é seguida por imunossupressão, causada pela exaustão e morte celular, culminando em falência de órgãos e choque séptico. Próprio autor. Criado com BioRender.com

1.1 Sistema purinérgico e Adenosina

O Sistema Purinérgico é composto por purinas, derivados nucleotídeos e nucleosídeos responsáveis por atuar nas vias bioquímicas envolvidas no metabolismo energético celular e sinalização (Shantharaja et al., 2022). Os componentes desse sistema atuam como sinalizadores, molécula de energia e, em caso de morte celular, como padrão molecular associado ao dano (DAMP) (Pelegri, 2021). Desse modo, nucleosídeos e nucleotídeos são essenciais tanto para a energia celular quanto para o controle de outros processos fisiológicos, como a inflamação (YUAN et al., 2021). Os principais componentes da sinalização purinérgica são a adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), adenosina (ADO) e a inosina (DI VIRGILIO et al., 2020).

Nessa via, o ATP é hidrolisado sequencialmente em adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) pela enzima do tipo ectonucleotidase nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDases) denominada CD39. O AMP é convertido em ADO pela enzima ecto-5'-nucleotidase CD73 e, por fim, a ADO é degradada em inosina pela enzima adenosina deaminase (ADA) (Bagatini et al., 2019).

Dos 19 purinoreceptores existentes, quatro são receptores P1 de adenosina (A_1AR , $A_{2A}AR$, $A_{2B}AR$ e A_3AR) e os demais, P2X e P2Y, possuem afinidade aos demais nucleosídeos (BURNSTOCK, 2020). Diante disso, $A_{2A}AR$ e $A_{2B}AR$ são acoplados a proteína Gs (estimulatória), que ativa adenilil ciclase (AC) e aumenta o AMP cíclico (cAMP), enquanto A_1AR e A_3AR são acoplados a proteínas Gi (inibitória), que inibem a AC e reduzem o cAMP (PASQUINI et al., 2021; COPPI et al., 2021). Nesse contexto, ADO atua como mediador chave na inflamação e modula processos como infiltração de leucócitos, regulação de citocinas e repolarização do fenótipo das células imunes (ANTONIOLI et al., 2022).

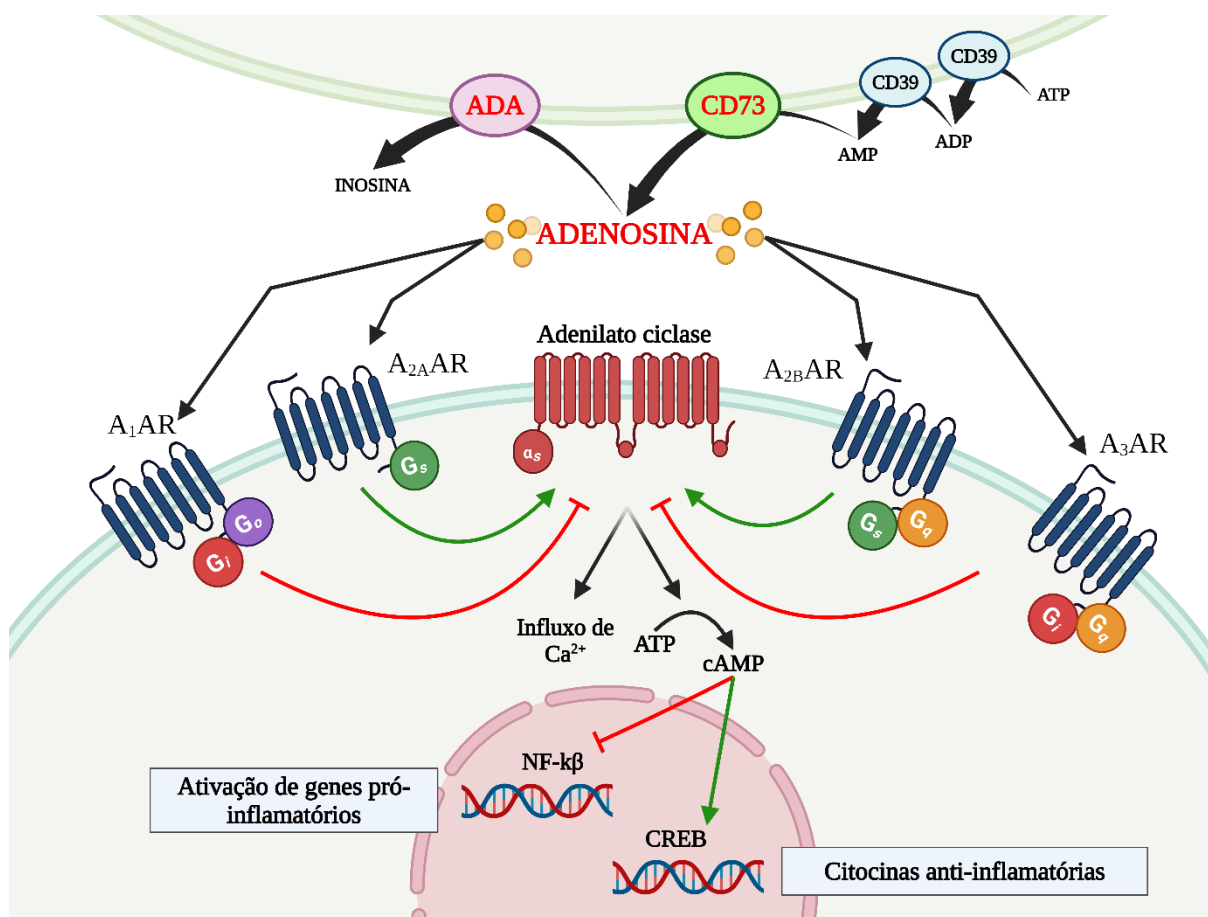


Figura 2. Sinalização purinérgica. Imagem esquemática representando a sinalização purinérgica com ênfase na produção de adenosina e sua resposta efetora de acordo com a modulação da via do AMP cíclico (AMPC) pelos receptores A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR e A₃AR. Próprio autor. Criado com BioRender.com

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o papel da adenosina na modulação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e suas implicações no agravamento e resolução da sepse.

2.2 Específicos

- Avaliar o papel da adenosina na sobrevivência de camundongos Balb-c wild type em modelos de sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP).
- Investigar o impacto da depleção de adenosina na sobrevivência de camundongos Balb-c wild type em um modelo de endotoxemia induzida por injeção de LPS.
- Analisar a extensão da lesão tecidual pulmonar em camundongos submetidos ao modelo de CLP.
- Examinar as lesões teciduais pulmonar e renal em camundongos submetidos ao modelo de endotoxemia.
- Avaliar o efeito da adenosina em neutrófilos polimorfonucleares isolados da medula óssea de camundongos Balb-c, após estimulação por PMA.
- Analisar o efeito da adenosina deaminase em neutrófilos polimorfonucleares isolados da medula óssea de camundongos Balb-c, após estimulação por PMA.
- Investigar o efeito da inibição do receptor $A_{2A}AR$ em neutrófilos polimorfonucleares isolados da medula óssea de camundongos Balb-c, após estimulação por PMA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Balb-c, machos, pesando entre 20 e 30 gramas, com idade entre 7 e 8 semanas, oriundos do Biotério Geral Universidade de São Paulo – campus de Ribeirão Preto. Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6-18 horas), com livre acesso à alimentação e água em gaiolas ventiladas individualmente. Todos os animais experimentais foram eutanasiados pelo método recomendado para pequenos roedores – que foi o deslocamento da medula espinhal na região cervical, de acordo com a Resolução Normativa nº 6, de 10 de julho de 2012, do CONCEA. Os animais eutanasiados foram mantidos em freezer até o momento do descarte pela empresa responsável, seguindo normas internacionais.

3.2 Indução de sepse por ligadura e punção cecal

A anestesia dos camundongos foi induzida por inalação de isoflurano a 2% (0,8 L/min) no ar até a ausência do reflexo podal e mantida com isoflurano a 1,2% (0,6 L/min) no ar. Após a anestesia geral, realizou-se a depilação do abdômen e a assepsia com álcool a 70%. Em seguida, foi feita uma pequena incisão para exteriorizar o ceco. Utilizando um fio de algodão 2-0, realizou-se a ligadura do ceco próximo à válvula ileocecal. Após a ligadura, a porção isolada do ceco foi transfixada duas vezes com uma agulha de 18 gauss, desde o ponto de ligadura até a porção mais distal do ceco. O fio da ligadura foi seccionado a um centímetro do ponto de saída, funcionando como dreno do conteúdo cecal para a cavidade peritoneal (DRECHSLER; OSUCHOWSKI, 2021). Após o procedimento, os animais foram suturados com fio de seda 5-0 e a região foi limpa com álcool a 70%. Finalmente, administrou-se 1 mL de solução salina estéril (a 37°C) por via subcutânea para reidratação. Nos animais controle-sham, o ceco foi apenas exteriorizado, sem a realização da transfixação. Após o procedimento, os animais foram colocados em gaiolas pós-operatórias, sob luz incandescente por 1 hora.

Procedimento de Ligadura e Punção Cecal (CLP)

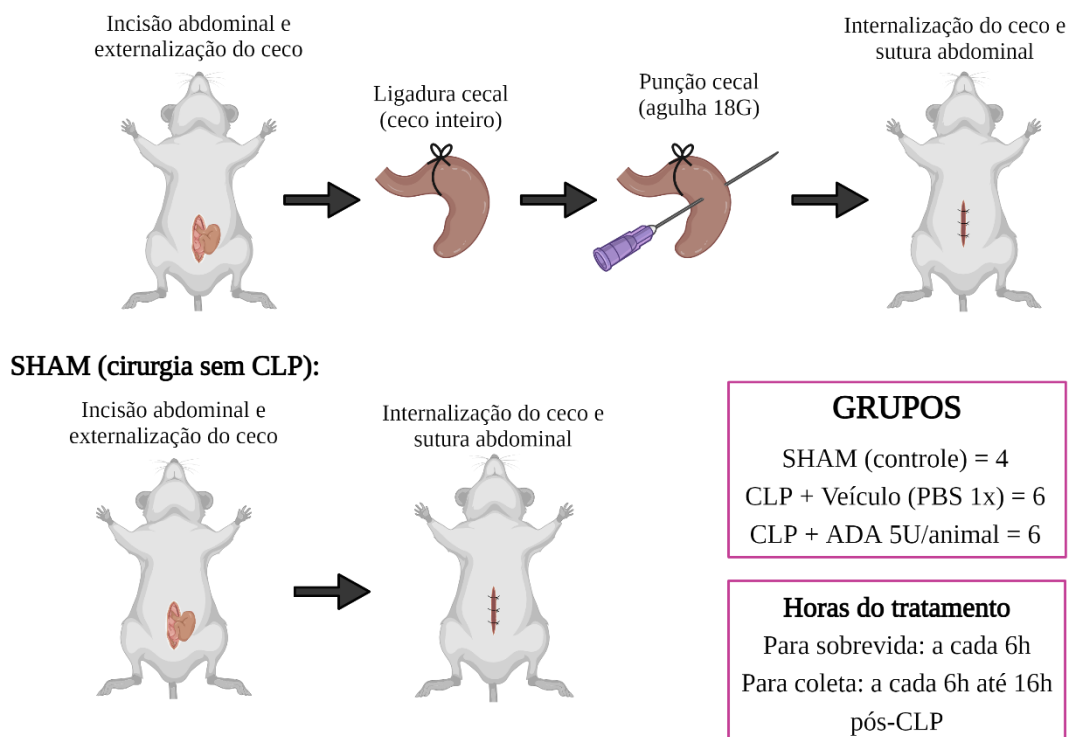


Figura 3. Desenho esquemático do experimento de ligadura e punção cecal. Próprio autor. Criado com BioRender.com.

3.1 Indução de endotoxemia por LPS para análise de sobrevivência

Para a indução de endotoxemia, foram utilizados 15 camundongos machos da linhagem Balb-c, com idades entre 7 e 8 semanas. O LPS foi sonificado por 10 minutos antes do uso e administrado via intraperitoneal na concentração de 40 mg/kg em 10 animais, enquanto no grupo controle ($n = 5$) foram administrados 200 μ L de solução salina, também por via intraperitoneal. Além disso, entre os animais induzidos, 5 foram tratados com Adenosina Deaminase (ADA) (Sigma™ #A5168) na concentração de 5U/animal, e 5 foram tratados com veículo (PBS 1x), com as doses administradas via intraperitoneal no momento da indução e depois a cada 6 horas. O tempo de coleta foi decidido após determinar a curva de sobrevivência.

Experimento de sobrevida da endotoxemia

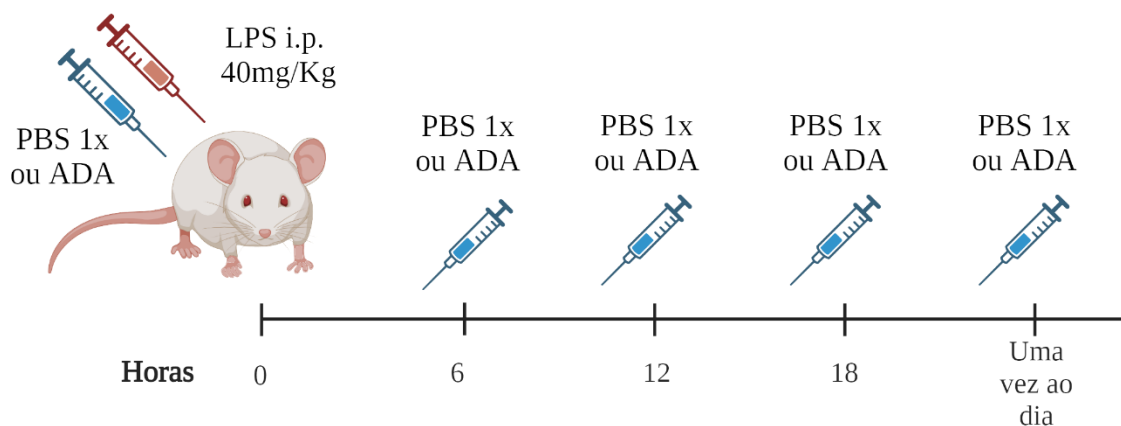


Figura 4. Diagrama esquemático do experimento de sobrevida e coleta de amostras de camundongos endotoxêmicos. Próprio autor. Criado com BioRender.com

3.1 Coleta órgãos

Para a coleta dos órgãos, os animais foram perfundidos com PBS 1x para remoção de sangue residual nos tecidos. Em seguida, foram coletados o pulmão e os rins, sendo o pulmão e o rim esquerdo armazenados em paraformaldeído (PFA) a 4% por 24 horas e, posteriormente, encaminhado para o processamento das lâminas histológicas.

3.1 Confeção das lâminas histológicas

Após a fixação em PFA 4%, os tecidos foram transferidos para uma série de concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Em seguida, os tecidos foram transferidos duas vezes para xilol e então imersos em parafina líquida a 60°C e embebidos em blocos de parafina para solidificação. Os blocos foram então cortados em um micrótomo em seções de 4-5 micrômetros de espessura, e os cortes foram montados em lâminas de vidro. As lâminas foram desparafinizadas com xilol e hidratadas em uma série de concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 90%, 80% e 70%), sendo posteriormente lavadas com água destilada. Por fim, as lâminas foram coradas sequencialmente com hematoxilina e eosina, e uma lamínula foi montada utilizando meio de montagem.

3.2 Obtenção de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) da medula óssea de camundongos

Para isolamento de neutrófilos murinos os fêmures e tíbias de camundongos foram coletados, dissecados e imersos em álcool, em seguida transferidos para um tubo contendo PBS 1x. Após a coleta, as epífises dos ossos foram cortadas e, utilizando-se uma seringa de 10 mL e agulha de 25G, foi realizada a lavagem (*flush*) dos ossos em um tubo com filtro de 100 µm. O tubo com o fluido da lavagem foi centrifugado a 450g por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tampão de lise de hemácias foi adicionado ao pellet. Após 5 minutos, foi adicionado PBS 1x, e o tubo foi centrifugado novamente para que o sobrenadante fosse descartado e as células ressuspensas em 1 mL de PBS 1x para o gradiente de Percoll. Os gradientes de Percoll foram preparados em ordem de densidade, começando com 3 mL de Percoll 1119, seguido por 3 mL de Percoll 1077 e, por último, 1 mL da suspensão de células. As células em Percoll foram centrifugadas a 700g por 30 minutos com aceleração e desaceleração definidas em 1. Após a centrifugação, os PMNs foram coletados do gradiente e transferidos para outro tubo, onde foi adicionado meio RPMI incompleto (Sigma-Aldrich™ # R8755) e novamente centrifugado a 450g por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio RPMI incompleto. Por fim, 10 µL das células ressuspensas foram transferidos para um tubo contendo 190 µL de solução de Turk para a contagem de células em câmara de Neubauer, utilizando a lente de 10x.

3.3 Cinética de detecção da liberação de NETs por Sytox™ Green

Para a leitura da cinética de liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos, foram utilizadas microplacas pretas de 96 poços. Em cada poço, foram adicionadas 250 mil células de neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos. Essas células foram pré-tratadas, exceto no grupo controle, durante 30 minutos com diferentes drogas: Adenosina Deaminase (ADA) (Sigma™ # A5168), 5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosine (NECA) (Tocris™ #1691) e ZM241385 (Sigma-Aldrich™ #Z0153). Após o pré-tratamento, as células foram estimuladas, exceto no grupo controle, com *phorbol myristate acetate* (PMA) 50 nM, e foram adicionados 2 µL de SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain (Invitrogen™ #S7020) a 500 µM em cada poço. A fluorescência das amostras foi medida com as configurações de excitação a 485 nm e emissão a 538 nm, em intervalos de 1 hora, durante 6 horas.

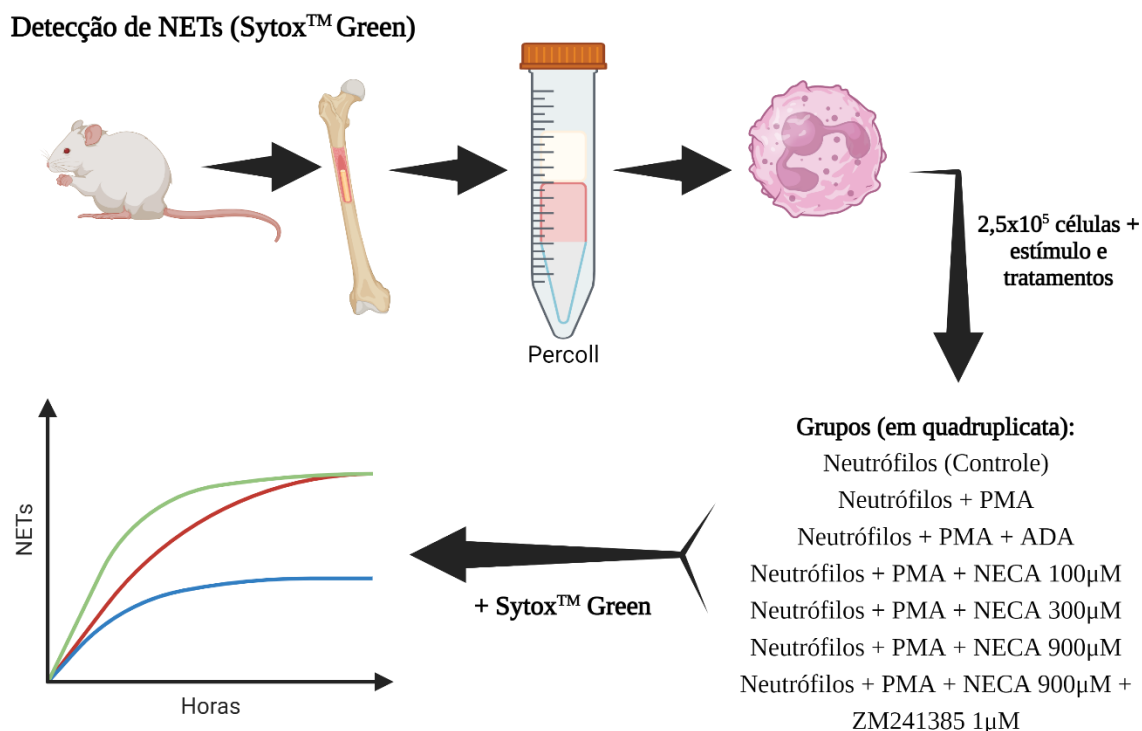


Figura 5. Desenho esquemático do experimento de cinética de detecção de NETs com Sytox™ Green. Próprio autor. Criado com BioRender.com.

3.4 Deteção de NETs por imunofluorescência direta

Para a detecção de NETs em cultura de células, os neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos foram estimulados por 5 horas em uma placa de até 24 poços com lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina hidrobrometo (Sigma™ #P1274). Após o estímulo, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado PFA 4% para fixação. Após a fixação, a lâmina foi lavada três vezes com PBS 1x. Posteriormente, as amostras foram bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente. Uma segunda lavagem foi realizada em PBS 1x + Tween 20 a 0,05%, três vezes. Em seguida, as amostras foram incubadas em 100 μL de Sytox a 5 μM por um período de 15 minutos ao abrigo da luz. Para a montagem final, foram adicionados meio de montagem contendo 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e uma lamínula de 9 mm. As lâminas foram deixadas para secar overnight no escuro.

3.5 Análise estatística

Os cálculos estatísticos e os respectivos gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism™. Para a análise da curva de sobrevida, foi aplicado o teste semiparamétrico de log-rank, ou Mantel-Cox, onde a morte (evento) é representada pelo valor 1 e os dados

censurados pelo valor 0. Nos gráficos de cinética, inicialmente foi calculada a área sob a curva (Area Under the Curve - AUC). Com o valor obtido, procedeu-se à análise utilizando ANOVA unidirecional (One-Way ANOVA), na qual a variável resposta é contínua, representada pelo valor Y, e a variável explanatória é categórica, representada pelo valor X. A significância estatística entre os dados foi considerada para valores de P menor ou igual a 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 A modulação da adenosina via adenosina deaminase (ADA) reduz a sobrevivência na sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP)

Inicialmente, investigou-se o papel da enzima Adenosina Deaminase na sobrevida da sepse induzida por ligadura e punção cecal, conforme descrito na metodologia. Para isso, realizou-se o procedimento de CLP em camundongos da linhagem Balb-c *wild type*, visando determinar a curva de sobrevida em três grupos: sham (controle da cirurgia), CLP + veículo (PBS 1x) e CLP + Adenosina Deaminase 5U. Após determinar a curva de sobrevida, foi realizada uma nova CLP para a coleta de pulmão 16 horas após o procedimento, com o objetivo de realizar análises histológicas utilizando coloração de hematoxilina e eosina (H&E). A curva de sobrevida (Figura 7) indica que a administração de ADA, enzima que cataboliza adenosina, agrava a sepse.

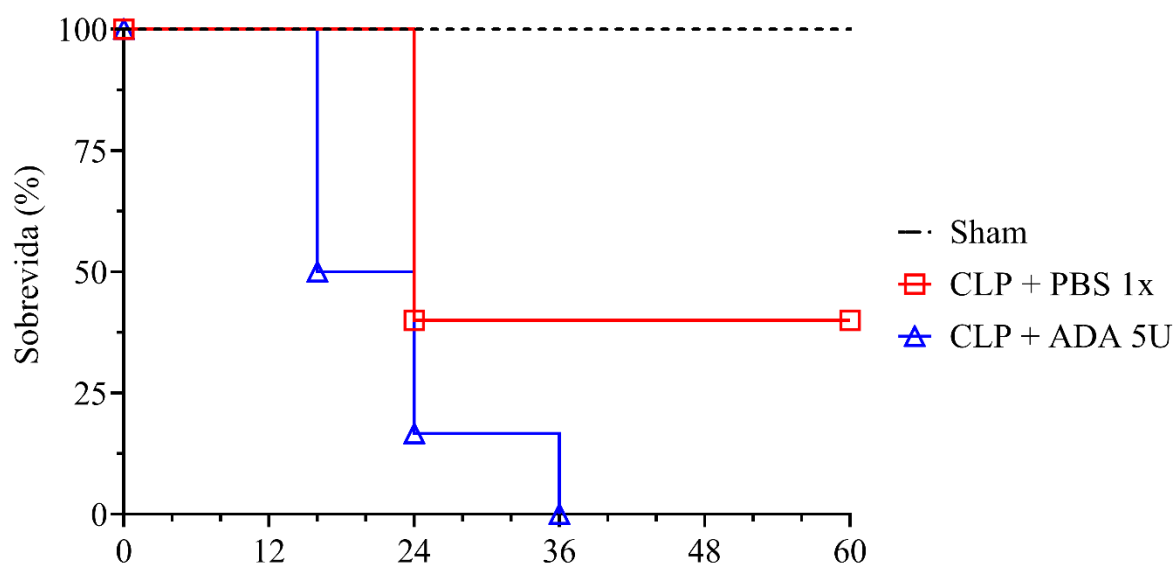


Figura 6. A Modulação da adenosina via adenosina deaminase (ADA) reduz a sobrevivência na sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP). Depleção de Adenosina via Adenosina Deaminase (ADA) Reduz a Taxa de Sobrevivência no Modelo de Ligadura e Punção Cecal (CLP). Curva de sobrevida, expressa em porcentagem, para os grupos sham (controle), CLP + PBS (veículo) e CLP + ADA 5U/animal. Seis animais por grupo, com os experimentos repetidos duas vezes. Para a análise estatística, os animais dos experimentos individuais foram agrupados. $P = 0.0057$ comparando CLP com CLP + ADA 5U. Teste de Mantel-Cox.

4.2 A modulação da adenosina via adenosina deaminase (ADA) agrava a lesão tecidual pulmonar na sepse induzida por CLP

A figura 8 demonstra que o tecido pulmonar do grupo controle está íntegro, enquanto que o grupo CLP + veículo apresenta infiltrado leucocitário e espaços alveolares preenchidos por material amorfo, róseo e homogêneo (líquido de edema) e o grupo CLP + ADA 5U apresenta edema ainda mais intenso e colapso do tecido alveolar intersticial com septos congestionados de hemácias, indicando hemorragia.

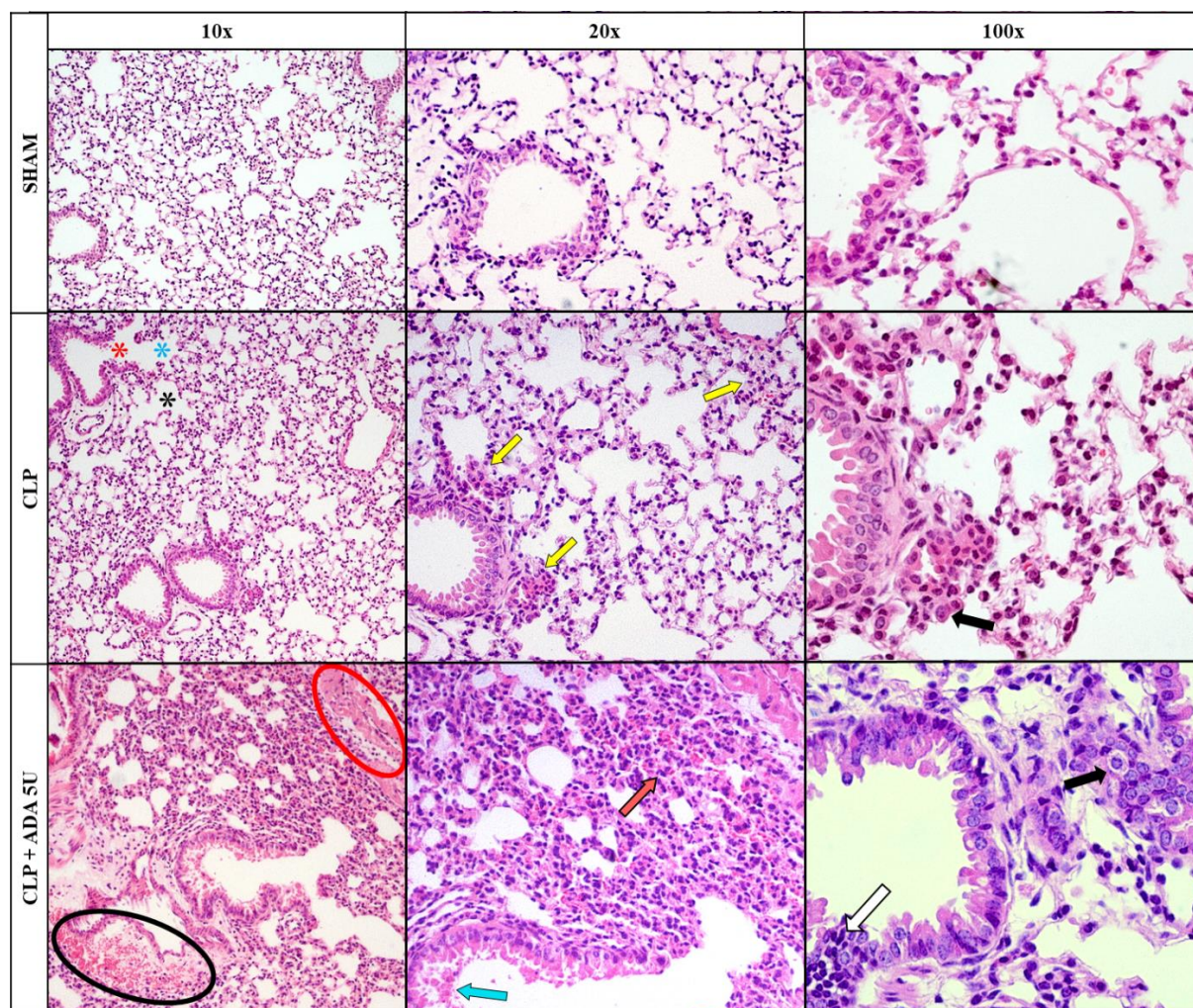


Figura 7. A modulação da adenosina via adenosina deaminase (ADA) agrava a lesão tecidual pulmonar na sepse induzida por CLP. Imagem representativa de corte histológico corado com H&E de pulmão de animais controle (sham), CLP + veículo e CLP + ADA 5U/animal. A coloração H&E mostrou alterações histológicas nos grupos CLP e, de forma mais grave, no grupo tratado com ADA. Asterisco vermelho = bronquíolo terminal; asterisco azul = ducto alveolar; asterisco preto = alvéolo; círculo vermelho = edema; círculo preto e seta vermelha = hemácias/hemorragia; setas

amarelas = infiltrado leucocitário; seta azul = necrose e descamação do bronquíolo; setas pretas = macrófagos alveolares; seta branca = infiltrado de linfócitos.

4.3 A modulação da adenosina via ADA reduz a sobrevivência em camundongos submetidos à endotoxemia induzida por LPS de *E. coli*

Com base no papel dual das NETs, que atua tanto como agente microbicida/resolutivo quanto como fator lesivo/agravante no modelo de ligadura e punção cecal, foi conduzido um estudo exposição exclusiva ao PAMP LPS para uma análise mais precisa do potencial modulador da adenosina na atividade das NETs.

Investigou-se então o papel da enzima Adenosina Deaminase na sobrevida da endotoxemia induzida por administração de LPS, conforme descrito na metodologia. Para isso, foi injetado LPS, na concentração de 40 mg/kg, via i.p., em camundongos da linhagem Balb-c *wild type*, visando determinar a curva de sobrevida em três grupos: controle + salina, LPS + veículo (PBS 1x) e LPS + Adenosina Deaminase 5U/animal. A curva de sobrevida (Figura 9) indica que a administração de ADA reduz também a sobrevida induzida pela endotoxemia.

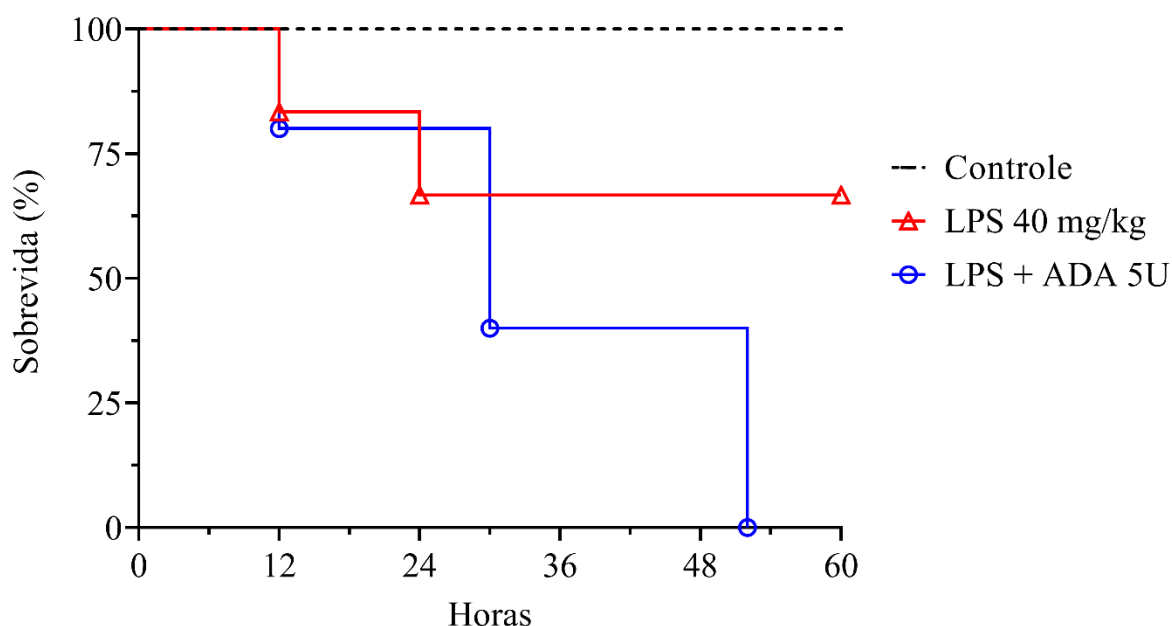


Figura 8. A modulação da adenosina via ADA reduz a sobrevivência em camundongos submetidos à endotoxemia induzida por LPS de *E. coli*. Curva de sobrevida, em porcentagem, para os grupos controle, LPS 40 mg/kg + PBS 1x e LPS + ADA 5U/animal. Cinco animais por grupo, com os experimentos repetidos duas vezes. Para a análise estatística, os animais dos experimentos individuais foram agrupados. $P = 0.0172$ comparando LPS com LPS + ADA 5U. Teste de Mantel-Cox.

4.4 A modulação da adenosina via ADA agrava a lesão pulmonar e renal na endotoxemia induzida por LPS

A figura 10 demonstra resultados semelhantes ao experimento de indução de sepse por CLP, com o tecido pulmonar do grupo controle íntegro e os demais grupos com edema, infiltrado leucocitário e congestão alveolar. Porém, o grupo LPS + ADA 5U também apresenta necrose e descamação dos bronquíolos e intensa congestão de hemácias, indicando hemorragia.

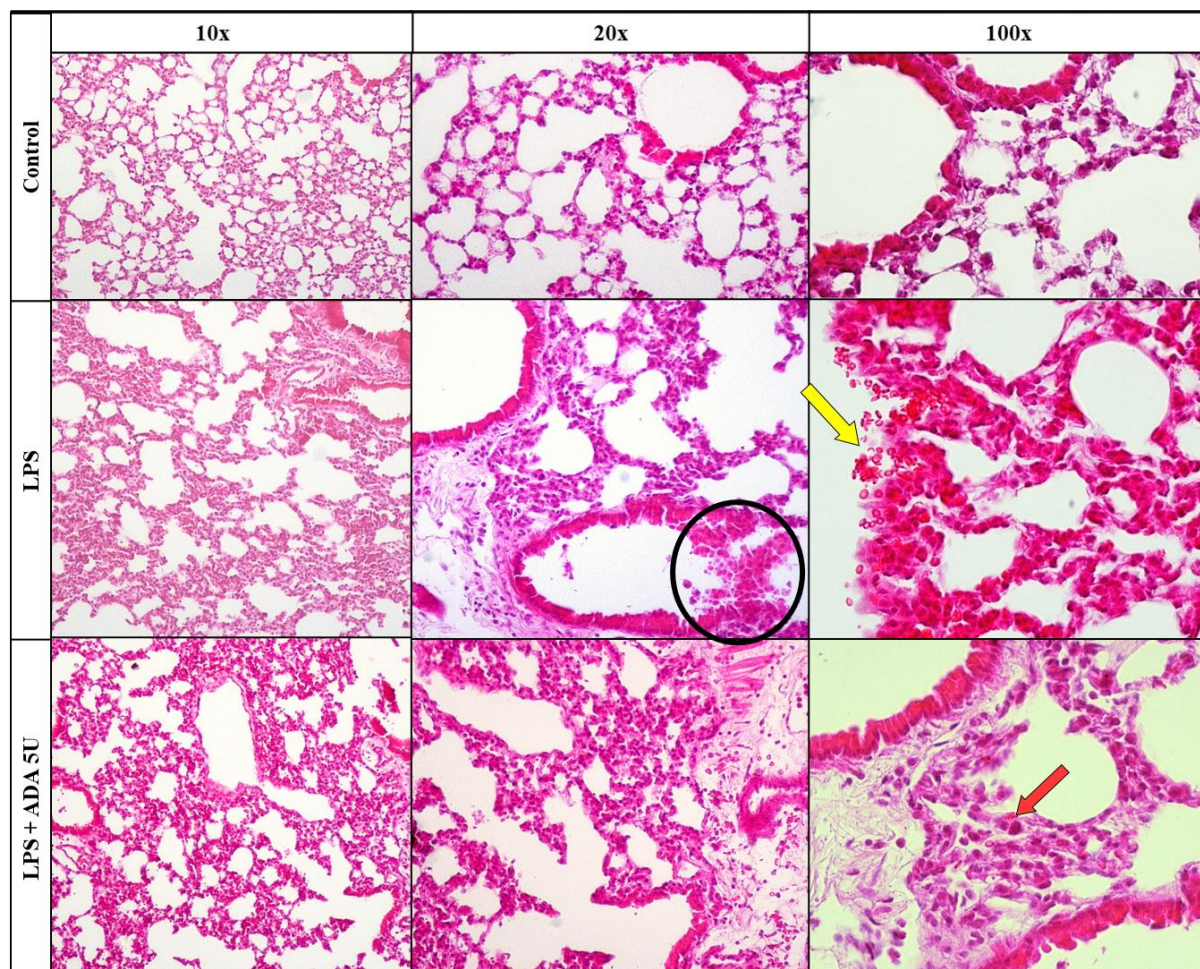


Figura 9. A modulação da adenosina via ADA agrava a lesão pulmonar na endotoxemia induzida por LPS. Imagem representativa de corte histológico corado com H&E de pulmão de animais controle, LPS + veículo e LPS + ADA 5U/animal. Círculo preto = necrose e descamação do bronquíolo; seta vermelha = macrófagos alveolares no infiltrado leucocitário; seta amarela = hemácias/hemorragia.

Já a figura 11 demonstra como a indução de endotoxemia por LPS atinge o tecido renal, comparando o grupo controle, íntegro, e os demais grupos com congestão dos túbulos corticais e parenquimais, dano e necrose glomerular, infiltrado leucocitário e hemorragia.

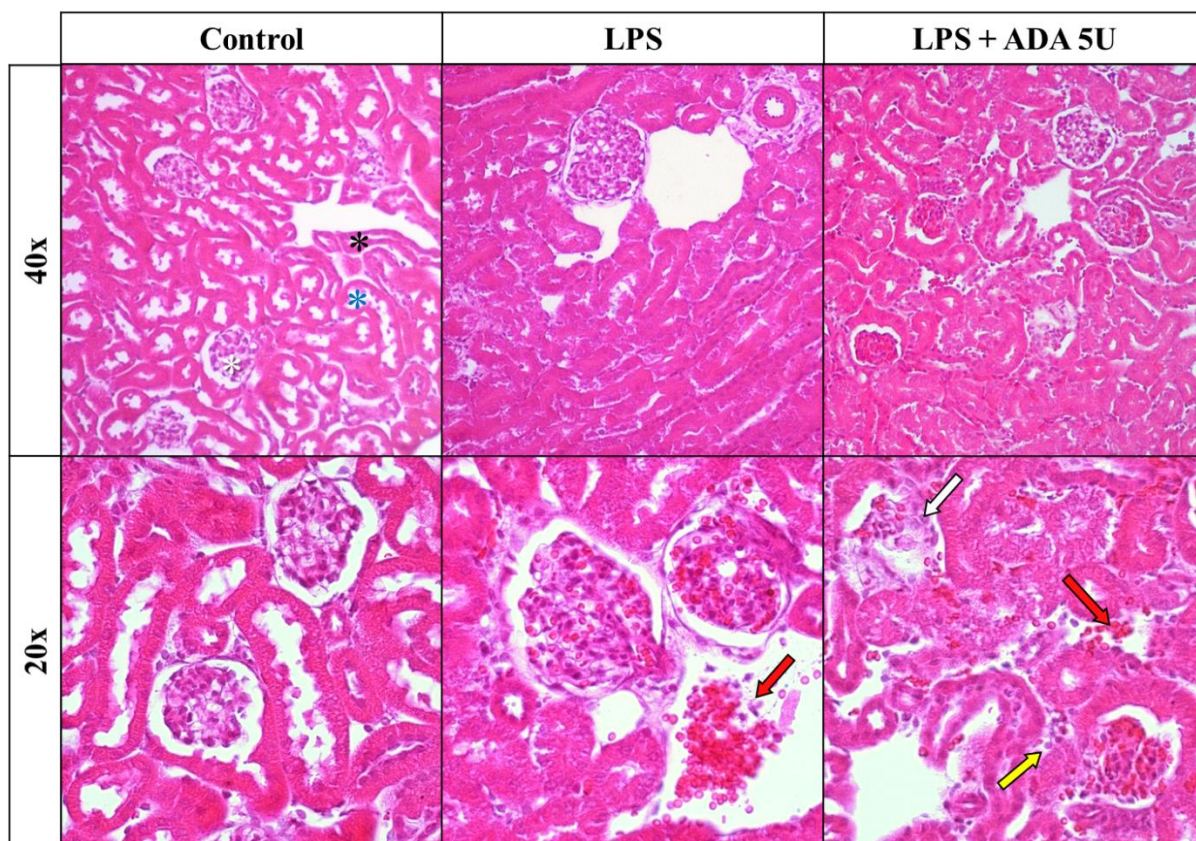


Figura 10. A modulação da adenosina via ADA agrava a lesão renal na endotoxemia induzida por LPS. Imagem representativa de corte histológico corado com H&E de rim de camundongos Balb-c controle, LPS + veículo e LPS + ADA 5U/animal. Asterisco branco = glomérulo; asterisco preto = túbulo proximal; asterisco azul = túbulo distal; seta branca = necrose glomerular; setas vermelhas = hemácias/hemorragia; seta amarela = infiltrado leucocitário.

4.5 A adenosina reduz a liberação de NETs induzida por PMA de maneira dose-dependente

Após a experimentação in vivo demonstrar que a adenosina possui efeito protetor na inflamação, foram realizados ensaios in vitro para avaliar se a adenosina ameniza a inflamação ao modular a liberação de NETs e por quais mecanismos atua. Para isso, foi utilizado PMA a 50nM, um estimulador de NETs bem descrito na literatura (LI et al, 2010; HIROKI et al, 2020). Dessa forma, a figura 12A que mostra a cinética e sua respectiva área sob a curva ilustrada em 12B indicam que ao pré-tratar os neutrófilos com um agonista dos receptores de adenosina, 5-(N-ethylcarboxamido)adenosine (NECA), em três diferentes concentrações, observou-se que a maior dose, de 900 μ M, reduziu significativamente a liberação de NETs induzidas por PMA.

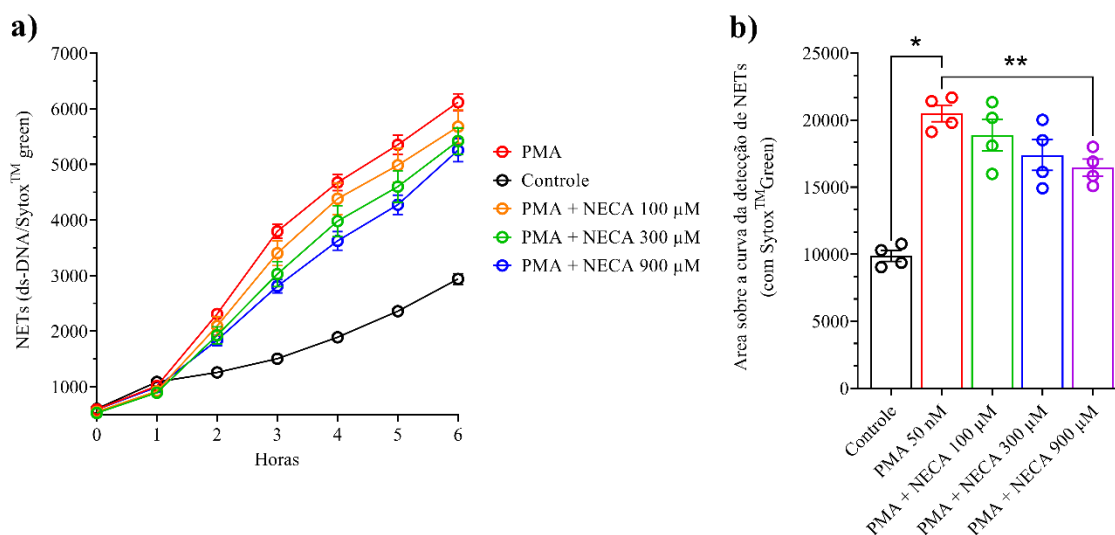


Figura 11. A adenosina reduz a liberação de NETs induzida por PMA de maneira dose-dependente. (a) Curva cinética e (b) área sob a curva da detecção de NETs (dsDNA-SytoxTM Green) em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Balb-c WT, estimulados por 5 horas com 50 μ M de PMA, com ou sem pré-tratamento com NECA nas concentrações de 100, 300 e 900 μ M. O número de neutrófilos por poço foi de 2.5×10^5 células, e os experimentos foram realizados em quadruplicado; * $P < 0.0001$ comparando Controle com o grupo PMA + NECA 100 μ M; ** $P = 0.0284$ comparando PMA com PMA + NECA 900 μ M; ANOVA unidirecional seguida pelo teste T de Student.

4.6 A degradação de adenosina via ADA aumenta a liberação de NETs induzida por PMA

Além de avaliar o efeito da adição de NECA em PMNs estimulados com PMA, também foi investigado se a depleção de adenosina, via tratamento com a enzima Adenosina Deaminase, aumentava a liberação de NETs. A cinética (figura 13A) e a respectiva área sob a curva (figura 13B) indicam que, ao metabolizar a adenosina, os neutrófilos estimulados liberam níveis significativamente mais altos de NETs em comparação aos neutrófilos apenas estimulados.

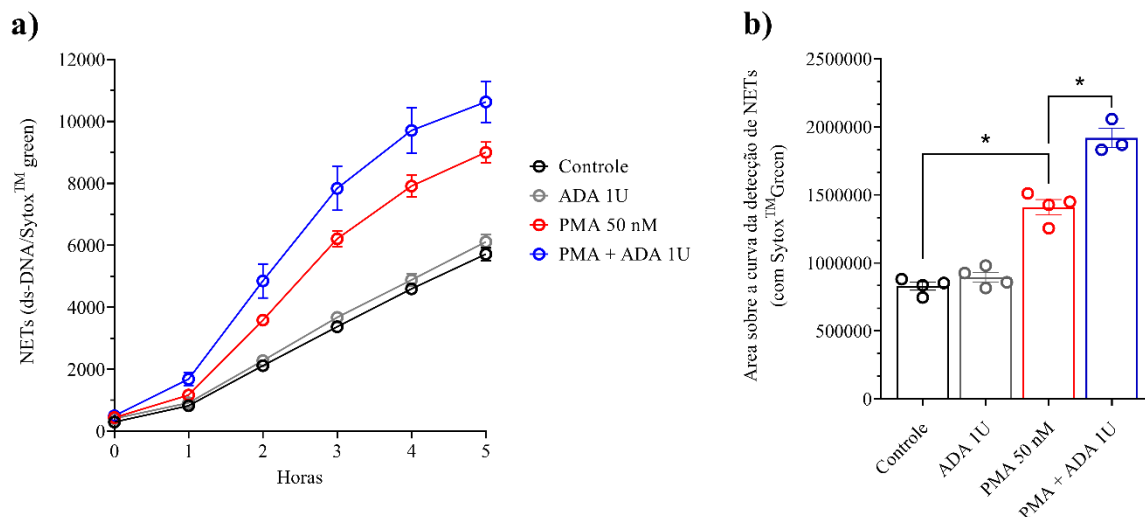


Figura 12. A degradação de adenosina via ADA aumenta a liberação de NETs induzida por PMA.

(a) Curva cinética e (b) área sob a curva da detecção de NETs em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Balb-c WT, estimulados por 5 horas com 50 μ M de PMA, com ou sem pré-tratamento com 1U de Adenosina Deaminase. O número de neutrófilos por poço foi de 2.5×10^5 células, e os experimentos foram realizados em quadruplicado. * $P < 0.0001$; ANOVA unidirecional seguida pelo teste T de Student.

Esse mesmo efeito também pôde ser visualizado na técnica de imunofluorescência, conforme representado na figura 14, que indica maior produção de NETs pelos PMNs estimulados com PMA e pré-tratados com ADA em comparação com aqueles sem pré-tratamento.

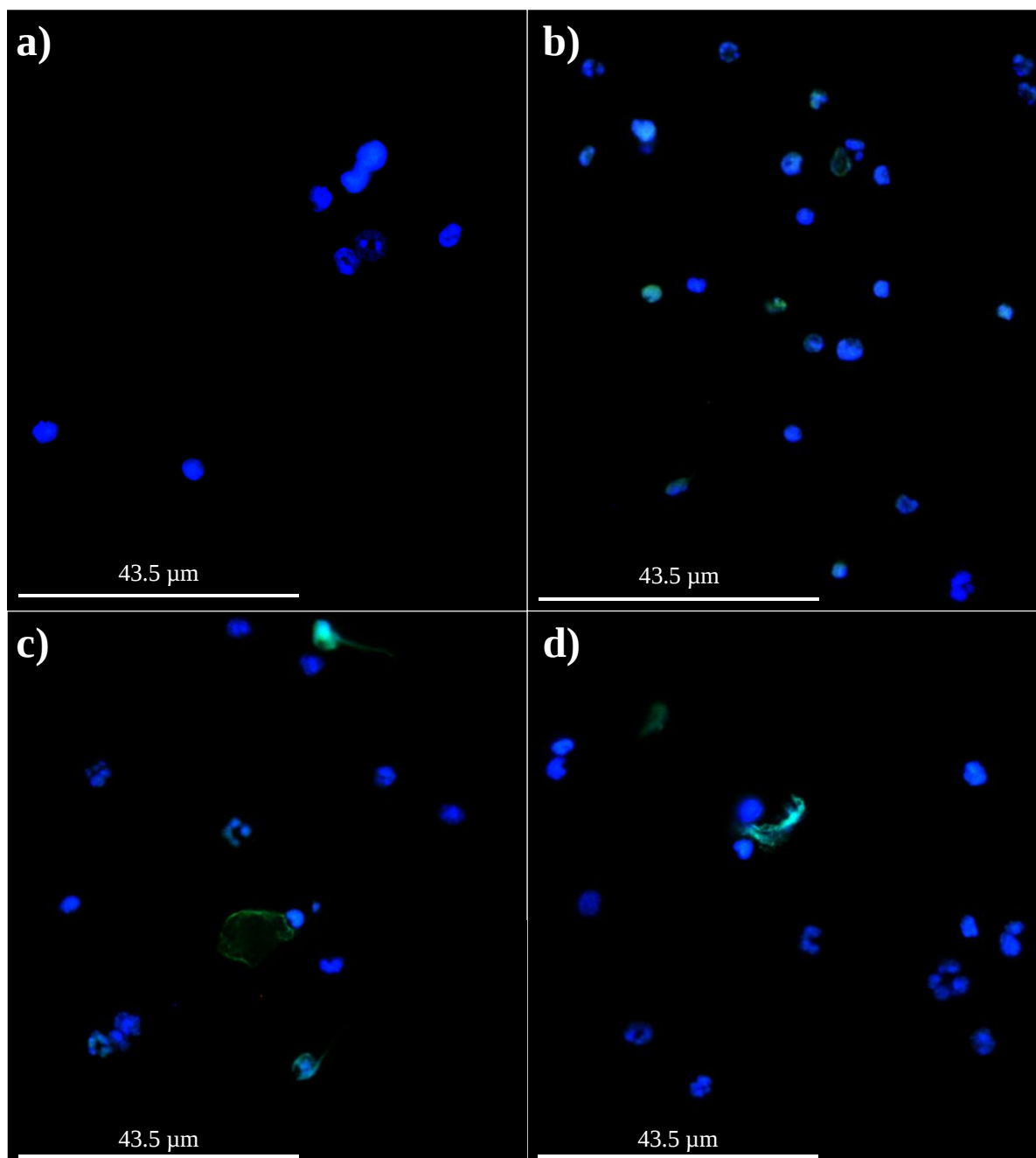


Figura 13. A degradação de adenosina via ADA aumenta as NETs induzidas por PMA. Imagens representativas de imunofluorescência de neutrófilos polimorfonucleares de camundongos WT: (a) controle, (b) estimulados com PMA 50 nM, e (c) e (d) estimulados com PMA 50 nM + pré-tratamento com ADA 1U. O DNA (intra e extracelular) foi marcado com DAPI, e o DNA extracelular foi marcado com SYTOX Green. As imagens foram capturadas com aumento de 40x.

4.7 O Receptor de Adenosina A2A Reduz a Liberação de NETs Estimuladas por PMA

Após avaliar o efeito da adenosina e de sua depleção via ADA de um modo geral, foi investigado o papel do receptor de adenosina A_{2A} ($A_{2A}AR$), uma vez que, segundo a literatura, este receptor é o principal responsável por inibir a formação de NETs. Para isso, os neutrófilos foram pré-tratados com o antagonista de $A_{2A}AR$, ZM241385, e com NECA, para ativar os demais receptores não inibidos, e então estimulados com PMA. Conforme indicado na figura 15, o uso do antagonista de $A_{2A}AR$ resultou em um aumento na formação de NETs, confirmando os dados da literatura.

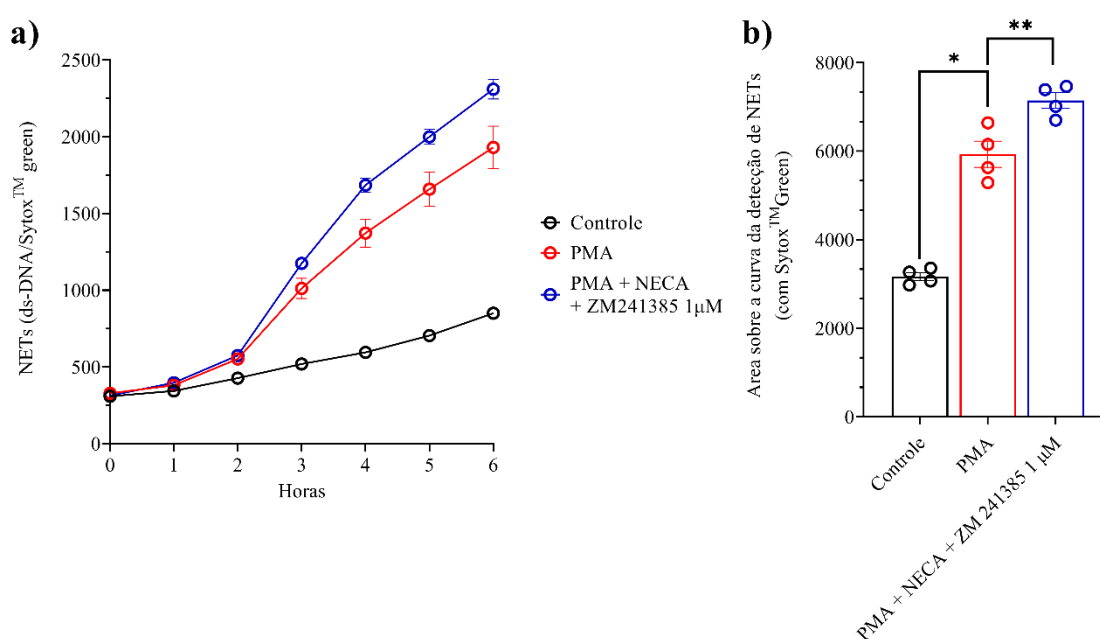


Figura 14. O receptor A_{2A} de adenosina reduz a liberação de NETs no estímulo com PMA. (a) Curva cinética e (b) área sob a curva da detecção de NETs em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Balb-c WT, estimulados por 5 horas com 50 μM de PMA, com ou sem pré-tratamento com NECA 900 μM + ZM241385 1 μM. O número de neutrófilos por poço foi de 2.5×10^5 células, e os experimentos foram realizados em quadruplicado. *P = 0.0051 comparando Controle com PMA; **P = 0.0001 comparando os grupos PMA com PMA + NECA + ZM241385; ANOVA unidirecional seguida pelo teste T de Student.

5 DISCUSSÃO

A sepse permanece uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países de baixa e alta renda, com aproximadamente 48,9 milhões de casos registrados globalmente (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2023). Notavelmente, devido à predominância de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento no hemisfério sul, a incidência de casos e mortalidade são significativamente maiores nesta região em comparação com o hemisfério norte (RUDD et al., 2020). Estudos realizados na última década sobre a fisiopatologia da sepse demonstram que as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), apesar de participarem dos mecanismos microbicidas do hospedeiro (CESTA et al., 2022), são responsáveis por agravar as lesões orgânicas observadas na sepse (SILVA et al., 2022; SCHNEIDER et al., 2023; RAMOS et al., 2021).

A liberação de NETs é consequência da ativação dos receptores TLRs pelos PAMPs e/ou DAMPs derivados de lesão tecidual, além dos efeitos das citocinas inflamatórias (JONES; BRENT, 2021). Além da liberação das NETs, o estímulo desses receptores desencadeia a síndrome inflamatória, que pode evoluir para choque e falência múltipla de órgãos (TORRES et al., 2022). Neste contexto, a inibição da produção e liberação de NETs é uma alternativa terapêutica que pode evitar as lesões de órgãos e, conseqüentemente, aumentar a sobrevivência dos pacientes sépticos. Estudos indicam que o aumento dos níveis de AMPc nas células reduz a produção de mediadores inflamatórios, incluindo a liberação de NETs pelos neutrófilos (MUTUA et al., 2020). O estímulo dos receptores A2a e A2b pela adenosina induz o aumento dos níveis de AMPc e, por conseguinte, reduz a produção de NETs em várias situações fisiopatológicas (PASQUINI et al., 2021; COPPI et al., 2021).

Em estudos anteriores (VERAS et al., 2023), corroborados pelo presente trabalho, demonstramos que, em modelos experimentais de endotoxemia e de ligadura e perfuração cecal (CLP) (KANNAN et al., 2024), a produção de NETs é um mediador chave nas lesões de órgãos. Além disso, evidenciamos que a administração da enzima Adenosina Deaminase (ADA), responsável pela degradação da adenosina (ADO), em um modelo in vivo de endotoxemia, agrava os sintomas e eleva a mortalidade da doença experimental. As análises histopatológicas revelaram características de inflamação pulmonar e renal aguda no modelo de endotoxemia, com lesões mais evidentes e graves no grupo tratado com ADA. Os animais apresentaram maior infiltrado leucocitário, hemorragia e necrose.

Atualmente, sabe-se que o PMA é um dos mais potentes indutores da formação de NETs (WANG et al., 2009; SAHA et al., 2019). Nesse contexto, assim como a redução de adenosina

resulta no agravamento da sepse e na liberação de NETs nos ensaios in vivo, foi demonstrado também que a produção de NETs por neutrófilos estimulados in vitro com PMA foi reduzida em neutrófilos pré-tratados com NECA, agonista dos receptores de adenosina (VINCENZI et al., 2023). Por outro lado, a depleção de ADO através da enzima Adenosina Deaminase (ADA) em PMNs mostrou um efeito contrário, com um aumento na liberação de NETs, que pode ser visualizada também nas imagens de imunofluorescência.

Além da análise dos efeitos extracelulares de ADO, foi demonstrado que o uso do inibidor do receptor de adenosina A_{2A} ($A_{2A}AR$), ZM241385, aumenta a liberação de NETs, o que confirma os achados na literatura de que a inibição de NETs depende não só da presença de adenosina, como também da expressão de receptores estimuladores da via AMPc (NASCIMENTO et al., 2021). Ademais, foi possível correlacionar a depleção de ADO e consequente aumento de NETs em PMNs estimulados com PMA com o agravamento e mortalidade da sepse, demonstrando que pode haver uma importância clínica nessa relação entre adenosina e sepse.

6 CONCLUSÃO

- A depleção de Adenosina via Adenosina Deaminase agrava a sepse;
- A depleção de Adenosina aumenta a lesão tecidual devido ao aumento na produção e liberação de NETs;
- O aumento de Adenosina extracelular possui efeito citoprotetor devido à redução de NETs;
- O receptor de Adenosina A2a possui papel chave na inibição de NETs em neutrófilos ativados.

7 REFERÊNCIAS

- 1 ACKERMANN, Maximilian; ANDERS, Hans-Joachim; BILYY, Rostyslav; *et al.* Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. **Cell Death & Differentiation**, v. 28, n. 11, p. 3125–3139, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41418-021-00805-z>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- 2 ANTONIOLI, Luca; PACHER, Pál; HASKÓ, György. Adenosine and inflammation: it's time to (re)solve the problem. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 43, n. 1, p. 43–55, 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614721001991>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 3 ARWYN-JONES, James; BRENT, Andrew J. Sepsis. **Surgery (Oxford)**, v. 39, n. 11, p. 714–721, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931921001988>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 4 BAGATINI, Margarete Dulce; BERTOLIN, Kalyne; BRIDI, Alessandra; *et al.* 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3 alters ectonucleotidase expression and activity in human cutaneous melanoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 120, n. 6, p. 9992–10000, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.28281>>. Acesso em: 22 set. 2024.
- 5 BALKRISHNA, Acharya; SINHA, Sugandh; KUMAR, Ashwani; *et al.* Sepsis-mediated renal dysfunction: Pathophysiology, biomarkers and role of phytoconstituents in its management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 165, p. 115183, 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332223009745>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 6 BAUER, Michael; COLDEWEY, Sina M.; LEITNER, Margit; *et al.* Deterioration of Organ Function As a Hallmark in Sepsis: The Cellular Perspective. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1460, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01460/full>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 7 BURNSTOCK, Geoffrey. Introduction to Purinergic Signaling. In: PELEGRÍN, Pablo (Org.). **Purinergic Signaling**. New York, NY: Springer New York, 2020, v. 2041, p. 1–15. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9717-6_1>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 8 CARACCILO, Massimo; CORREALE, Pierpaolo; MANGANO, Carmelo; *et al.* Efficacy and Effect of Inhaled Adenosine Treatment in Hospitalized COVID-19 Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 613070, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.613070/full>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 9 CASSATELLA, Marco Antonio; ÖSTBERG, Nataliya K.; TAMASSIA, Nicola; *et al.* Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 7, p. 648–664, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147149061930105X>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 10 CECCONI, Maurizio; EVANS, Laura; LEVY, Mitchell; *et al.* Sepsis and septic shock. **The Lancet**, v. 392, n. 10141, p. 75–87, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618306962>>. Acesso em: 12 maio 2024.
- 11 CESTA, Maria Candida; ZIPPOLI, Mara; MARSIGLIA, Carolina; *et al.* Neutrophil activation and neutrophil extracellular traps (NETs) in COVID-19 ARDS and immunothrombosis. **European Journal of Immunology**, v. 53, n. 1, p. 2250010, 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.202250010>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 12 CHAKRABORTY, Rebanta K.; BURNS, Bracken. Systemic Inflammatory Response Syndrome. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547669/>>. Acesso em: 12 ago. 2024.

- 13 CHAN, Lily; KARIMI, Negar; MOROVATI, Solmaz; *et al.* The Roles of Neutrophils in Cytokine Storms. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2318, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/11/2318>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 14 CHANG, Jae C. Sepsis and septic shock: endothelial molecular pathogenesis associated with vascular microthrombotic disease. **Thrombosis Journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2019. Disponível em: <<https://thrombosisjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12959-019-0198-4>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 15 CICCHINELLI, Sara; PIGNATARO, Giulia; GEMMA, Stefania; *et al.* PAMPs and DAMPs in Sepsis: A Review of Their Molecular Features and Potential Clinical Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 962, 2024. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/25/2/962>>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- 16 COLÓN, David F.; WANDERLEY, Carlos W.; FRANCHIN, Marcelo; *et al.* Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 113, 2019. Disponível em: <<https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-019-2407-8>>. Acesso em: 1 ago. 2024.
- 17 COPPI, Elisabetta; CHERCHI, Federica; LUCARINI, Elena; *et al.* Uncovering the Mechanisms of Adenosine Receptor-Mediated Pain Control: Focus on the A3 Receptor Subtype. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 7952, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/15/7952>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 18 CZAIKOSKI, Paula Giselle; MOTA, José Maurício Segundo Correia; NASCIMENTO, Daniele Carvalho; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148142, 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0148142>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 19 DANTAS, Márcio; SILVA, Lázaro Bruno Borges; PONTES, Barbhara Thaís Maciel; *et al.* Nefropatia membranosa. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 45, n. 2, p. 229–243, 2023. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-28002023000200229&tlng=pt>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 20 DI VIRGILIO, Francesco; SARTI, Alba Clara; COUTINHO-SILVA, Robson. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 318, n. 5, p. C832–C835, 2020. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00053.2020>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 21 DOS RAMOS ALMEIDA, Cícero José Luíz; VERAS, Flávio Protásio; PAIVA, Isadora Marques; *et al.* Neutrophil Virucidal Activity Against SARS-CoV-2 Is Mediated by Neutrophil Extracellular Traps. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 229, n. 5, p. 1352–1365, 2024. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article/229/5/1352/7453299>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- 22 DOS SANTOS RAMOS, Anderson; VIANA, Giovana Cristina Santana; DE MACEDO BRIGIDO, Marcelo; *et al.* Neutrophil extracellular traps in inflammatory bowel diseases: Implications in pathogenesis and therapeutic targets. **Pharmacological Research**, v. 171, p. 105779, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661821003637>>. Acesso em: 1 ago. 2024.
- 23 DRECHSLER, Susanne; OSUCHOWSKI, Marcin. Cecal Ligation and Puncture. In: WALKER, Wendy E. (Org.). **Sepsis**. New York, NY: Springer US, 2021, v. 2321, p. 1–8. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1488-4_1>. Acesso em: 16 ago. 2024.
- 24 EFFENDI, Wiwin Is; NAGANO, Tatsuya; KOBAYASHI, Kazuyuki; *et al.* Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 785, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/3/785>>. Acesso em: 13 ago. 2024.

- 25 FAJGENBAUM, David C.; JUNE, Carl H. Cytokine Storm. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2255–2273, 2020. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra2026131>>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- 26 FORTIN, Andrée; HARBOUR, Danielle; FERNANDES, Maria; *et al.* Differential expression of adenosine receptors in human neutrophils: up-regulation by specific Th1 cytokines and lipopolysaccharide. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 3, p. 574–585, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jleukbio/article/79/3/574/6922480>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 27 FUCHS, Andre; TUFA, Tafese Beyene; HÖRNER, Johannes; *et al.* Clinical and microbiological characterization of sepsis and evaluation of sepsis scores. **PLOS ONE**, v. 16, n. 3, p. e0247646, 2021. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0247646>>. Acesso em: 13 maio 2024.
- 28 GATICA, Sebastian; FUENTES, Brandon; RIVERA-ASÍN, Elizabeth; *et al.* Novel evidence on sepsis-inducing pathogens: from laboratory to bedside. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1198200, 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1198200/full>>. Acesso em: 13 maio 2024.
- 29 GAUER, Robert; FORBES, Damon; BOYER, Nathan. Sepsis: Diagnosis and Management. **American Family Physician**, v. 101, n. 7, p. 409–418, 2020.
- 30 GHNEWA, Y. G.; FISH, M.; JENNINGS, A.; *et al.* Goodbye SIRS? Innate, trained and adaptive immunity and pathogenesis of organ dysfunction. **Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin**, v. 115, n. S1, p. 10–14, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00063-020-00683-2>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 31 GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Evangelos J.; ASCHENBRENNER, Anna C.; BAUER, Michael; *et al.* The pathophysiology of sepsis and precision-medicine-based immunotherapy. **Nature Immunology**, v. 25, n. 1, p. 19–28, 2024. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41590-023-01660-5>>. Acesso em: 24 jul. 2024.
- 32 GIAMBELLUCA, Miriam S; POULIOT, Marc. Early tyrosine phosphorylation events following adenosine A2A receptor in human neutrophils: identification of regulated pathways. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 102, n. 3, p. 829–836, 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jleukbio/article/102/3/829/6935365>>. Acesso em: 6 ago. 2024.
- 33 GIERLIKOWSKA, Barbara; STACHURA, Albert; GIERLIKOWSKI, Wojciech; *et al.* The Impact of Cytokines on Neutrophils' Phagocytosis and NET Formation during Sepsis—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 5076, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/5076>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 34 GONG, Huankai; CHEN, Yao; CHEN, Meiling; *et al.* Advanced development and mechanism of sepsis-related acute respiratory distress syndrome. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 1043859, 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.1043859/full>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 35 GULBINS, E.; LANG, K. S. Immunsystem. In: BRANDES, Ralf; LANG, Florian; SCHMIDT, Robert F. (Orgs.). **Physiologie des Menschen**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019, p. 312–323. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-56468-4_25>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 36 GYAWALI, Bishal; RAMAKRISHNA, Karan; DHAMOON, Amit S. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. **SAGE Open Medicine**, v. 7, p. 205031211983504, 2019. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2050312119835043>>. Acesso em: 11 maio 2024.
- 37 HARVANOVÁ, Gabriela; DURANKOVÁ, Silvia; BERNASOVSKÁ, Jarmila. The role of cytokines and chemokines in the inflammatory response. **Alergologia Polska - Polish Journal of**

- Allergy**, v. 10, n. 3, p. 210–219, 2023. Disponível em:
<<https://www.termedia.pl/doi/10.5114/pja.2023.131708>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 38 HIROKI, Carlos H.; TOLLER-KAWAHISA, Juliana E.; FUMAGALLI, Marcilio J.; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Effectively Control Acute Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 3108, 2020. Disponível em:
<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.03108/full>>. Acesso em: 1 ago. 2024.
- 39 HOLLENBERG, Steven M.; SINGER, Mervyn. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology**, v. 18, n. 6, p. 424–434, 2021. Disponível em:
<<https://www.nature.com/articles/s41569-020-00492-2>>. Acesso em: 11 maio 2024.
- 40 HUANG, Min; CAI, Shaoli; SU, Jingqian. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5376, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/21/5376>>. Acesso em: 13 maio 2024.
- 41 JARCZAK, Dominik; NIERHAUS, Axel. Cytokine Storm—Definition, Causes, and Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11740, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/19/11740>>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- 42 JORCH, Selina K.; KUBES, Paul. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 3, p. 279–287, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm.4294>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 43 JOST, Laura Nyland; BIZUTI, Matheus Ribeiro. Sinalização purinérgica nas doenças renais. In: CARDOSO, Andréia Machado; MANFREDI, Leandro Henrique; MACIEL, Sarah Franco Vieira De Oliveira (Orgs.). **Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas**. [s.l.]: Editora UFFS, 2021, p. 211–220. Disponível em: <<https://books.scielo.org/id/hj25v/pdf/cardoso-9786586545494-12.pdf>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 44 KANNAN, Shravan Kumar; KIM, Caleb Y.; HEIDARIAN, Mohammad; *et al.* Mouse Models of Sepsis. **Current Protocols**, v. 4, n. 3, p. e997, 2024. Disponível em: <<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpz1.997>>. Acesso em: 25 jul. 2024.
- 45 KIWIT, Antonia; LU, Yuqing; LENZ, Moritz; *et al.* The Dual Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Sepsis and Ischemia-Reperfusion Injury: Comparative Analysis across Murine Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 7, p. 3787, 2024. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/25/7/3787>>. Acesso em: 6 ago. 2024.
- 46 KLOTZ, Karl-Norbert. Adenosine receptors and their ligands. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 382–391, 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s002100000315>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 47 KOCH, Mariana Schechtel; DREWNOWSKI, Bianca; BUENO, Bruna França; *et al.* General aspects of myeloperoxidase and its involvement in diseases: a brief review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 28677–28691, 2021. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/26753/21181>>. Acesso em: 1 ago. 2024.
- 48 KRAUS RF, GRUBER MA. Neutrophils—From Bone Marrow to First-Line Defense of the Innate Immune System. **Front Immunol** [Internet]. 23 de dezembro de 2021 [citado 9 de setembro de 2024];12:767175. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.767175/full>
- 49 KUMAR, Sanni; PAYAL, Nazrana; SRIVASTAVA, Vijay Kumar; *et al.* Neutrophil extracellular traps and organ dysfunction in sepsis. **Clinica Chimica Acta**, v. 523, p. 152–162, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898121003235>>. Acesso em: 18 jun. 2024.

- 50 LEHMAN, Heather K.; SEGAL, Brahm H. The role of neutrophils in host defense and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 145, n. 6, p. 1535–1544, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674920304255>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 51 LELUBRE, Christophe; VINCENT, Jean-Louis. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 417–427, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41581-018-0005-7>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 52 LI, Pingxin; LI, Ming; LINDBERG, Michael R.; *et al.* PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 9, p. 1853–1862, 2010. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/207/9/1853/40971/PAD4-is-essential-for-antibacterial-innate>>. Acesso em: 1 ago. 2024.
- 53 LI, Xin-Yao; LIU, Mei; FU, Ya-Jing; *et al.* Alterations in levels of cytokine following treatment to predict outcome of sepsis: A meta-analysis. **Cytokine**, v. 161, p. 156056, 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466622002654>>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- 54 LIU, Di; HUANG, Si-Yuan; SUN, Jian-Hui; *et al.* Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options. **Military Medical Research**, v. 9, n. 1, p. 56, 2022. Disponível em: <<https://mmrjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40779-022-00422-y>>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- 55 MATTA, Bharati; BATTAGLIA, Jenna; BARNES, Betsy J. Detection of neutrophil extracellular traps in patient plasma: method development and validation in systemic lupus erythematosus and healthy donors that carry IRF5 genetic risk. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 951254, 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.951254/full>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 56 MURAO A, AZIZ M, WANG H, BRENNER M, WANG P. Release mechanisms of major DAMPs. **Apoptosis** [Internet]. 2021 [citado 9 de setembro de 2024];26(3–4):152–62. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10495-021-01663-3>
- 57 MUTUA, Victoria; GERSHWIN, Laurel J. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 61, n. 2, p. 194–211, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s12016-020-08804-7>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- 58 NASCIMENTO, Daniele Carvalho; VIACAVA, Paula Ramos; FERREIRA, Raphael Gomes; *et al.* Sepsis expands a CD39+ plasmablast population that promotes immunosuppression via adenosine-mediated inhibition of macrophage antimicrobial activity. **Immunity**, v. 54, n. 9, p. 2024-2041.e8, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761321003356>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 59 NEDEVA, Christina. Inflammation and Cell Death of the Innate and Adaptive Immune System during Sepsis. **Biomolecules**, v. 11, n. 7, p. 1011, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/11/7/1011>>. Acesso em: 4 jul. 2024.
- 60 NIEDERMAN, Michael S.; BARON, Rebecca M.; BOUADMA, Lila; *et al.* Initial antimicrobial management of sepsis. **Critical Care**, v. 25, n. 1, p. 307, 2021. Disponível em: <<https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-021-03736-w>>. Acesso em: 13 maio 2024.
- 61 OU, Qian; FANG, Jia-qi; ZHANG, Zhe-sheng; *et al.* TcpC inhibits neutrophil extracellular trap formation by enhancing ubiquitination mediated degradation of peptidylarginine deiminase 4. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 3481, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-021-23881-8>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 62 PASQUINI, Silvia; CONTRI, Chiara; BOREA, Pier Andrea; *et al.* Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14,

- p. 7685, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/14/7685>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 63 PAWLUK, Hanna; WOŹNIAK, Alina; GRZEŚK, Grzegorz; *et al.* <p>The Role of Selected Pro-Inflammatory Cytokines in Pathogenesis of Ischemic Stroke</p>. **Clinical Interventions in Aging**, v. 15, p. 469–484, 2020. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/the-role-of-selected-pro-inflammatory-cytokines-in-pathogenesis-of-isc-peer-reviewed-fulltext-article-CIA>>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- 64 PELEGRIN, Pablo. P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: Partners in crime. *Biochemical Pharmacology*, v. 187, p. 114385, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295220306213>>. Acesso em: 22 set. 2024.
- 65 PIIRAINEN, Henni; ASHOK, Yashwanth; NANEKAR, Rahul T.; *et al.* Structural features of adenosine receptors: From crystal to function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 5, p. 1233–1244, 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273610001707>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 66 PINTO, Carolina Ferreira; WATANABE, Mirian; FONSECA, Cassiane Dezoti Da; *et al.* A sepsse como causa de lesão renal aguda: modelo experimental. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, n. spe, p. 86–90, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0080-62342012000700013&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 67 PISETSKY, David S. Pathogenesis of autoimmune disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 19, n. 8, p. 509–524, 2023. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41581-023-00720-1>>. Acesso em: 4 jul. 2024.
- 68 PULLI, Benjamin; ALI, Muhammad; FORGHANI, Reza; *et al.* Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67976, 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0067976>>. Acesso em: 1 ago. 2024.
- 69 RESHETNYAK, Tatiana; NURBAEVA, Kamila. The Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus and Antiphospholipid Syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 17, p. 13581, 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/24/17/13581>>. Acesso em: 4 jul. 2024.
- 70 RIEDEMANN, Niels C.; GUO, Ren-Feng; WARD, Peter A. Novel strategies for the treatment of sepsis. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 517–524, 2003. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm0503-517>>. Acesso em: 13 maio 2024.
- 71 RIFF, Reut; NAAMANI, Oshri; MAZAR, Julia; *et al.* A1 and A2A adenosine receptors play a protective role to reduce prevalence of autoimmunity following tissue damage. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 205, n. 3, p. 278–287, 2021. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cei/article/205/3/278/6431088>>. Acesso em: 1 jul. 2024.
- 72 ROSALES, Carlos. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 1, p. 377–396, 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jleukbio/article/108/1/377/6884420>>. Acesso em: 4 jul. 2024.
- 73 RUDD, Kristina E; JOHNSON, Sarah Charlotte; AGESA, Kareha M; *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200–211, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673619329897>>. Acesso em: 24 jul. 2024.
- 74 SAHA, Piu; YEOH, Beng San; XIAO, Xia; *et al.* PAD4-dependent NETs generation are indispensable for intestinal clearance of *Citrobacter rodentium*. **Mucosal Immunology**, v. 12, n. 3, p. 761–771, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1933021922004202>>. Acesso em: 27 jul. 2024.

- 75 SAITOH, Tatsuya; KOMANO, Jun; SAITOH, Yasunori; *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 1, p. 109–116, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312812002016>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 76 SCHNEIDER, Ayda Henriques; TAIRA, Thaise Mayumi; PÚBLIO, Gabriel Azevedo; *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate bone erosion in rheumatoid arthritis by enhancing RANKL-induced osteoclastogenesis. **British Journal of Pharmacology**, v. 181, n. 3, p. 429–446, 2024. Disponível em: <<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.16227>>. Acesso em: 1 ago. 2024.
- 77 SCHOPPMAYER, Rouven; VAN BUUL, Jaap D. The diapedesis synapse: dynamic leukocyte-endothelium interactions. **Current Opinion in Physiology**, v. 19, p. 1–9, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468867320300523>>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- 78 SENDER, Ron; WEISS, Yarden; NAVON, Yoav; *et al.* The total mass, number, and distribution of immune cells in the human body. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 44, p. e2308511120, 2023. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/10.1073/pnas.2308511120>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 79 **Sepse: um problema de saúde pública**. Brasília: Conselho Federal de Medicina, 2015.
- 80 SHANTHARAJA *et al.*, Novel biocompatible amide phthalocyanine for simultaneous electrochemical detection of adenine and guanine, **Microchemical Journal**, v. 175, p. 107223, 2022.
- 81 SHAPPELL, Claire; RHEE, Chanu; KLOMPAS, Michael. Update on Sepsis Epidemiology in the Era of COVID-19. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 44, n. 01, p. 173–184, 2023. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-1759880>>. Acesso em: 12 maio 2024.
- 82 SILVA, Camila Meirelles S.; WANDERLEY, Carlos Wagner S.; VERAS, Flavio Protasio; *et al.* Gasdermin-D activation by SARS-CoV-2 triggers NET and mediate COVID-19 immunopathology. **Critical Care**, v. 26, n. 1, p. 206, 2022. Disponível em: <<https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-022-04062-5>>. Acesso em: 1 ago. 2024.
- 83 SPEL, Lotte; MARTINON, Fabio. Gasdermin D opens the way for NETs. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 14, n. 12, p. 690–692, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41584-018-0124-3>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 84 SUO, Chenqu; DANN, Emma; GOH, Issac; *et al.* Mapping the developing human immune system across organs. **Science**, v. 376, n. 6597, p. eabo0510, 2022. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abo0510>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 85 TAN, Chuyi; AZIZ, Monowar; WANG, Ping. The vitals of NETs. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 110, n. 4, p. 797–808, 2021. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jleukbio/article/110/4/797/6884613>>. Acesso em: 4 jul. 2024.
- 86 TEIJEIRA, Alvaro; GARASA, Saray; OCHOA, Maria C.; *et al.* IL8, Neutrophils, and NETs in a Collusion against Cancer Immunity and Immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 9, p. 2383–2393, 2021. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/clincancerres/article/27/9/2383/672188/IL8-Neutrophils-and-NETs-in-a-Collusion-against>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 87 TORRES, Lisa K.; PICKKERS, Peter; VAN DER POLL, Tom. Sepsis-Induced Immunosuppression. **Annual Review of Physiology**, v. 84, n. 1, p. 157–181, 2022. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-061121-040214>>. Acesso em: 18 jun. 2024.

- 88 TSOUROUKTSOGLU, Theodora-Dorita; WARNATSCH, Annika; IOANNOU, Marianna; *et al.* Histones, DNA, and Citrullination Promote Neutrophil Extracellular Trap Inflammation by Regulating the Localization and Activation of TLR4. **Cell Reports**, v. 31, n. 5, p. 107602, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124720305519>>. Acesso em: 4 jul. 2024.
- 89 TU, Zhaoxu; ZHONG, Yiling; HU, Hanze; *et al.* Design of therapeutic biomaterials to control inflammation. **Nature Reviews Materials**, v. 7, n. 7, p. 557–574, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41578-022-00426-z>>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- 90 URSO, Andreacarola; PRINCE, Alice. Anti-Inflammatory Metabolites in the Pathogenesis of Bacterial Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 925746, 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.925746/full>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 91 VAN DER HOEVEN, Dharini; AUCHAMPACH, John A. Characterization of expression and function of adenosine receptors in mouse neutrophils. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 4, 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fasebj.20.4.A249-c>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 92 VERAS, Flavio P.; GOMES, Giovanni F.; SILVA, Bruna M. S.; *et al.* Targeting neutrophils extracellular traps (NETs) reduces multiple organ injury in a COVID-19 mouse model. **Respiratory Research**, v. 24, n. 1, p. 66, 2023. Disponível em: <<https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-023-02336-2>>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- 93 VINCENZI, Fabrizio; PASQUINI, Silvia; CONTRI, Chiara; *et al.* Pharmacology of Adenosine Receptors: Recent Advancements. **Biomolecules**, v. 13, n. 9, p. 1387, 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/13/9/1387>>. Acesso em: 1 ago. 2024.
- 94 WANG, Jing; TANG, Bin; YOU, Xihuo; *et al.* Trichinella spiralis excretory/secretory products from adult worms inhibit NETosis and regulate the production of cytokines from neutrophils. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 374, 2023. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-023-05979-8>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 95 WANG, Xuesong; GUO, Zhe; CHAI, Yan; *et al.* Application Prospect of the SOFA Score and Related Modification Research Progress in Sepsis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 10, p. 3493, 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-0383/12/10/3493>>. Acesso em: 11 maio 2024.
- 96 WANG, Yanming; LI, Ming; STADLER, Sonja; *et al.* Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. **Journal of Cell Biology**, v. 184, n. 2, p. 205–213, 2009. Disponível em: <<https://rupress.org/jcb/article/184/2/205/54031/Histone-hypercitrullination-mediates-chromatin>>. Acesso em: 27 jul. 2024.
- 97 YU, Chang-meng; WANG, Yi; REN, Shi-chun; *et al.* Caffeic acid modulates activation of neutrophils and attenuates sepsis-induced organ injury by inhibiting 5-LOX/LTB4 pathway. **International Immunopharmacology**, v. 125, p. 111143, 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576923014698>>. Acesso em: 8 ago. 2024.
- 98 YUAN, Xiaoyi; FERRARI, Davide; MILLS, Tingting; *et al.* Editorial: Purinergic Signaling and Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 699069, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.699069/full>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- 99 ZARBOCK, Alexander; NADIM, Mitra K.; PICKKERS, Peter; *et al.* Sepsis-associated acute kidney injury: consensus report of the 28th Acute Disease Quality Initiative workgroup. **Nature Reviews Nephrology**, v. 19, n. 6, p. 401–417, 2023. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41581-023-00683-3>>. Acesso em: 13 ago. 2024.

- 100 ZHAO, Chen; LIANG, Fangte; YE, Mengling; *et al.* GSDMD promotes neutrophil extracellular traps via mtDNA-cGAS-STING pathway during lung ischemia/reperfusion. **Cell Death Discovery**, v. 9, n. 1, p. 368, 2023. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41420-023-01663-z>>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- 101 ZOU, Shujing; JIE, Hongyu; HAN, Xinai; *et al.* The role of neutrophil extracellular traps in sepsis and sepsis-related acute lung injury. **International Immunopharmacology**, v. 124, p. 110436, 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576923007592>>. Acesso em: 8 ago. 2024.

8 Comprovante de submissão de artigo científico



Ana Flavia O. Pampolha <ana.flaviapampolha@gmail.com>

Scientific Reports - Receipt of Manuscript 'The adenosinergic signaling...'

1 mensagem

Scientific Reports <srep@nature.com>

25 de agosto de 2024 às 21:58

Para: ana.flaviapampolha@gmail.com

Ref: Submission ID 940b6024-7e6d-4ab8-8aac-81075e2a40c5

Dear Dr Pampolha¹,

Please note that you are listed as a co-author on the manuscript "The adenosinergic signaling regulates the severity of sepsis and the neutrophil extracellular traps release", which was submitted to Scientific Reports on 26 August 2024 UTC.

If you have any queries related to this manuscript please contact the corresponding author, who is solely responsible for communicating with the journal.

Kind regards,

Peer Review Advisors
Scientific Reports